



ISSN 2304-196X (Print)  
ISSN 2658-6959 (Online)

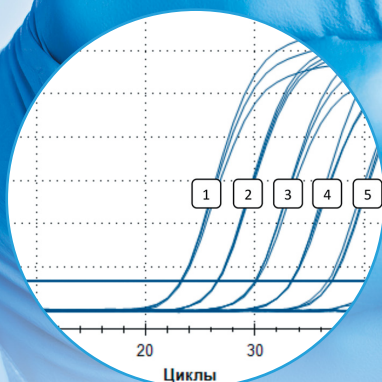
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ  
И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ  
(РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)  
ФГБУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ  
ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»

# ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ

РУССКО-АНГЛИЙСКИЙ  
ЖУРНАЛ

VETERINARY SCIENCE  
TODAY

RUSSIAN-ENGLISH JOURNAL



ВЫЯВЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ  
*CAMPYLOBACTER* SPP.  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ  
В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ  
с. 3

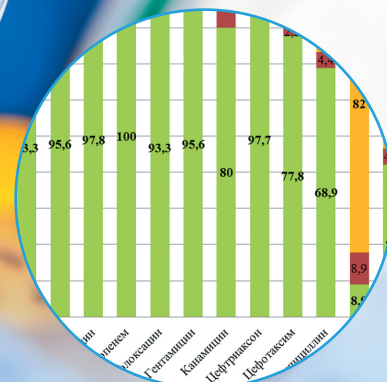
**DETECTION OF *CAMPYLOBACTER* SPP.  
WITH REAL-TIME POLYMERASE  
CHAIN REACTION**  
p. 8

Журнал «Ветеринария сегодня» включен в Перечень  
рецензируемых научных изданий (ВАК):  
03.02.02 – Вирусология (ветеринарные науки),  
06.02.02 – Ветеринарная микробиология, вирусология,  
эпизоотология, микология с микотоксикологией  
и иммунология (ветеринарные науки).



БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА  
ИЗОЛЯТОВ *STAPHYLOCOCCUS*  
*AUREUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МОЛОКА  
И МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ,  
ПРОИЗВЕДЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ  
РЕСПУБЛИКИ КРЫМ  
с. 13

**BIOLOGICAL CHARACTERISTICS  
OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*  
ISOLATES RECOVERED FROM  
MILK AND DAIRY PRODUCTS  
MANUFACTURED  
IN THE REPUBLIC OF CRIMEA**  
p. 19



СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА  
И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ  
ИЗОЛЯТОВ БАКТЕРИЙ  
РОДА *SALMONELLA*, ВЫДЕЛЕННЫХ  
ИЗ СЫРЬЯ ЖИВОТНОГО  
ПРОИСХОЖДЕНИЯ  
с. 25

**SEROLOGICAL CHARACTERISTICS  
AND ANTIMICROBIAL  
RESISTANCE OF  
*SALMONELLA* ISOLATES,  
RECOVERED FROM ANIMAL  
RAW MATERIAL**  
p. 25

*Миссией издания является представление информации об основных направлениях развития ветеринарной науки и практики и привлечение внимания научных сообществ к актуальным проблемам и инновационным разработкам в области ветеринарии*

*The journal's mission is the delivery of information on basic development trends of veterinary science and practice and highlighting of vital issues and innovative developments in veterinary area for scientific community*

**Главный редактор:**

Лозовой Дмитрий Анатольевич — доктор ветеринарных наук, заместитель директора по НИР и развитию ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, тел./факс: 8 (4922) 26-15-73, e-mail: lozovoy@arriah.ru

**Шеф-редактор:** Юлия Мелано

**Выпускающие редакторы:** Ольга Лаврухина, Анастасия Мазнева

**e-mail:** [vet\\_today@arriah.ru](mailto:vet_today@arriah.ru),

[lavruhina@arriah.ru](mailto:lavruhina@arriah.ru); 8 (4922) 26-15-12, доб. 22-27

**Editor-in-Chief:**

Dmitry A. Lozovoy — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Deputy Head for Research and Development, FGBI "ARRIAH", Vladimir Tel/fax: 8 (4922) 26-15-73, e-mail: lozovoy@arriah.ru

**Editorial Director:** Julia Melano

**Executive Editors:** Olga Lavruhina, Anastasia Mazneva

**e-mail:** [vet\\_today@arriah.ru](mailto:vet_today@arriah.ru),

[lavruhina@arriah.ru](mailto:lavruhina@arriah.ru); 8 (4922) 26-15-12, ext. 22-27

**Редакционный совет журнала «Ветеринария сегодня»:**

**Болдбаатар Базарцэрэн** — доктор ветеринарных наук, Институт ветеринарной медицины, г. Улан-Батор, Монголия

**Бучацкий Л. П.** — доктор биологических наук, профессор, КНУ им. Тараса Шевченко, г. Киев, Украина

**Гринь С. А.** — доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, ФГБНУ ВНИИБП, г. Щелково, Россия

**Забережный А. Д.** — доктор биологических наук, профессор, ВИЭВ им. Я. Р. Коваленко, г. Москва, Россия

**Кузьмина Е. В.** — доктор ветеринарных наук, Краснодарский НИВИ — обособленное структурное подразделение ФГБНУ КНЦЗВ, г. Краснодар, Россия

**Ломако Ю. В.** — кандидат ветеринарных наук, доцент, РУП ИЭВ им. С. Н. Вышелеского, г. Минск, Беларусь

**Мищенко Н. В.** — доктор биологических наук, доцент, ВЛГУ им. А. Г. и Н. Г. Столетовых, г. Владимир, Россия

**Настасиевич Иван** — доктор ветеринарных наук, Институт гигиены и технологии мяса, Белград, Сербия

**Недосеков В. В.** — доктор ветеринарных наук, профессор, Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев, Украина

**Никитин И. Н.** — доктор ветеринарных наук, ФГБОУ «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана», Казань

**Савченкова И. П.** — доктор биологических наук, профессор, ВИЭВ им. Я. Р. Коваленко, г. Москва, Россия

**Самарджия Марко** — доктор ветеринарных наук, профессор, Загребский университет, г. Загреб, Хорватия

**Сидорчук А. А.** — доктор ветеринарных наук, профессор, профессор кафедры Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К. И. Скрябина, г. Москва

**Соколович Марьяна** — доктор ветеринарных наук, Хорватский ветеринарный институт — Птицеводческий центр, г. Загреб, Хорватия

**Сулейманов С. М.** — доктор ветеринарных наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, Воронежский ГАУ им. императора Петра I, г. Воронеж, Россия

**Федотов С. В.** — доктор ветеринарных наук, профессор, Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К. И. Скрябина, г. Москва, Россия

**Чернов А. Н.** — доктор биологических наук, ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИИВ», г. Казань, Россия

**Эрдэнэбаатар Жанчивдорж** — доктор ветеринарных наук, Институт ветеринарной медицины, г. Улан-Батор, Монголия

**Editorial council:**

**Boldbaatar Bazartseren** — PhD/DVM, Leading Researcher, Laboratory Head, Institute of Veterinary Medicine, Ulan Bator, Mongolia

**Buchatsky L. P.** — Doctor of Science (Biology), Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

**Grin S. A.** — Doctor of Science (Biology), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Schelkovo, Russia

**Zaberezhny A. D.** — Doctor of Science (Biology), Professor, All-Russian Research Institute for Experimental Veterinary Medicine n. a. Ya. R. Kovalenko, Moscow, Russia

**Kuzminova Ye. V.** — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Krasnodar RIVM — economically autonomous structural subdivision of FGBNU KRCZVM, Krasnodar, Russia

**Lomako Yu. V.** — Candidate of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Research RUE Institute of the Experimental Veterinary Medicine of S. N. Vyshelsky, Minsk, Belarus

**Mishchenko N. V.** — Doctor of Science (Biology), Associate Professor, Vladimir State University n. a. A. G. and N. G. Stoletovs, Vladimir, Russia

**Nastasijevic I.** — PhD/DVM, Associate Director, Head of Technology Development and Transfer Department, Institute of Meat Hygiene and Technology, Belgrade, Serbia

**Nedosekov V. V.** — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

**Nikitin I. N.** — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Bauman Kazan State Academy of Veterinary Medicine, Kazan

**Savchenkova I. P.** — Doctor of Science (Biology), Professor, FGBRI All-Russian Research Institute for Experimental Veterinary Medicine n. a. Ya. R. Kovalenko, Moscow, Russia

**Samardžija M.** — PhD/DVM, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

**Sidorchuk A. A.** — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow

**Sokolovic M.** — PhD/DVM, Professor, Deputy Laboratory Head/Deputy QM, CVI-Poultry Centre, Zagreb, Croatia

**Suleymanov S. M.** — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Honorary Scientist of the Russian Federation, Voronezh State Agrarian University n. a. Peter the First, Voronezh, Russia

**Fedotov S. V.** — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia

**Chernov A. N.** — Doctor of Science (Biology), FGBRI Federal Centre for Toxicological, Radiological and Biological Safety, Kazan, Russia

**Erdenebaatar Janchivdorj** — PhD/DVM, Professor, Leading Researcher, Institute of Veterinary Medicine, Ulan Bator, Mongolia

**Дизайн и верстка:** Мария Бондарь

**Корректор:** Ирина Зверева

**Design and composition:** Maria Bondar

**Proof-reader:** Irina Zvereva

Журнал «Ветеринария сегодня» зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций, свидетельство о регистрации № ФС 77-49033 от 21 марта 2012 г.

The Journal "Veterinary Science Today" is registered in the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology, and Mass Media Federal Service, Registration Certificate No FS 77-49033, March 21, 2012.

Научный журнал «Ветеринария сегодня» включен в информационно-аналитическую систему — Российский индекс научного цитирования (РИНЦ) и каталог журналов открытого доступа DOAJ. Электронные версии журнала размещаются в полнотекстовом формате на сайте Научной электронной библиотеки eLIBRARY.RU, в каталоге DOAJ и по адресу <http://veterinary.arriah.ru/jour/index>. Зарегистрированный товарный знак, свидетельство № 514190.

Scientific Journal "Veterinary Science Today" is included in the information analysis system — Russian Science Citation Index (RSCI) and Directory of Open Access Journals (DOAJ). Full-text e-versions of the Journal are published on the website of the Scientific Electronic Library, eLIBRARY.RU, DOAJ, and <http://veterinary.arriah.ru/jour/index>. Registered trademark, certificate No 514190.

## Редакционная коллегия журнала «Ветеринария сегодня»:

### Editorial Board:



**Василевич Ф. И.** — доктор биологических наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой паразитологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии им. К. И. Скрябина, г. Москва

**Vasilyevich F. I.** — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Academician of the Russian Academy of Sciences, Professor, K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow



**Власов Н. А.** — доктор биологических наук, профессор, зам. руководителя Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору, г. Москва

**Vlasov N. A.** — Doctor of Science (Biology), Professor, Deputy Head of the Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance, Moscow



**Груздев К. Н.** — доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

**Gruzdev K. N.** — Doctor of Science (Biology), Chief Researcher, FGBI "ARRIAH", Vladimir



**Гулюкин М. И.** — доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, ФГБНУ ВНИИЗЖ им. Я. Р. Коваленко, г. Москва

**Gulyukin M. I.** — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Honorary Scientist of the Russian Federation, FGBRI All-Russian Research Institute for Experimental Veterinary Medicine n. a. Ya. R. Kovalenko, Moscow



**Иголкин А. С.** — кандидат ветеринарных наук, зав. лабораторией ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

**Igolkin A. S.** — Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of the Reference Laboratory, FGBI "ARRIAH", Vladimir



**Ирза В. Н.** — доктор ветеринарных наук, главный эксперт ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

**Irza V. N.** — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Chief Expert, FGBI "ARRIAH", Vladimir



**Красочко П. А.** — доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор Витебской государственной академии ветеринарной медицины, г. Витебск, Республика Беларусь

**Krasochko P. A.** — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Doctor of Science (Biology), Professor, Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Belarus



**Макаров В. В.** — доктор биологических наук, профессор, академик РАЕН, РУДН, г. Москва

**Makarov V. V.** — Doctor of Science (Biology), Professor, Academician of the Russian Academy of Natural Sciences, RUDN, Moscow



**Метлин А. Е.** — доктор ветеринарных наук, заместитель директора по науке ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва

**Metlin A. Ye.** — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Deputy Head for Research, FGBI "VGNKI", Moscow



**Мищенко В. А.** — доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

**Mishchenko V. A.** — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Chief Researcher, FGBI "ARRIAH", Vladimir



**Плющиков В. Г.** — доктор сельскохозяйственных наук, профессор, директор Аграрно-технологического института РУДН, г. Москва

**Plyuschnikov V. G.** — Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Director of Agrarian and Technological Institute, RUDN, Moscow



**Прохватилова Л. Б.** — кандидат биологических наук, доцент, начальник отдела координации НИР ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

**Prokhvatilova L. B.** — Candidate of Science (Biology), Associate Professor, Head of the Department for Research Coordination, FGBI "ARRIAH", Vladimir



**Прунтова О. В.** — доктор биологических наук, профессор, главный эксперт ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

**Pruntova O. V.** — Doctor of Science (Biology), Professor, Chief Expert, FGBI "ARRIAH", Vladimir



**Русалеев В. С.** — доктор ветеринарных наук, профессор, ученый секретарь ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

**Russaleev V. S.** — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Scientific Secretary, FGBI "ARRIAH", Vladimir



**Самуйленко А. Я.** — доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, ФГБНУ ВНИИЗЖ, г. Щелково

**Samuylenko A. Ya.** — Academician of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, FGBNU VNITIBP, Schelkovo



**Сисягин П. Н.** — доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН, ФГБНУ НИВИ НЗ России, г. Нижний Новгород

**Sisayagin P. N.** — Associate Member of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, FGBNU NIVI NC Russia, Nizhny Novgorod



**Старов С. К.** — кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник, заместитель директора по качеству ФГБУ «ВНИИЗЖ» (зам. глав. редактора), г. Владимир

**Starov S. K.** — Candidate of Science (Veterinary Medicine), Chief Researcher, Deputy Director for Quality, FGBI "ARRIAH", (Deputy Editor-in-Chief), Vladimir



**Субботин А. М.** — доктор биологических наук, профессор, член Коллегии (министр) по промышленности и агропромышленному комплексу Евразийской экономической комиссии

**Subbotin A. M.** — Doctor of Science (Biology), Professor, Member of the Board — Minister in charge of Industry and Agriculture of the Eurasian Economic Commission



**Чвала И. А.** — кандидат ветеринарных наук, заместитель директора по НИР и мониторингу ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

**Chvala I. A.** — Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), Deputy Head for Research and Monitoring, FGBI "ARRIAH", Vladimir



**Шахов А. Г.** — доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН, ФГБНУ «ВНИИПФит», г. Воронеж

**Shakhov A. G.** — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Associate Member of the Russian Academy of Sciences, FGBNU VNIPAT, Voronezh

Тираж 2000 экземпляров. Цена свободная  
**Учредитель:** 600901, г. Владимир, мкр. Юрьеvec, ФГБУ «ВНИИЗЖ»  
**Издатель:** ООО «Да Винчи Медиа», 121069, г. Москва, ул. Поварская, д. 31/29, пом. VI, комн. 13  
**Адрес редакции:** 600901, г. Владимир, мкр. Юрьеvec, ФГБУ «ВНИИЗЖ»

Circulation: 2000. Price: unregulated  
**Establisher:** 600901, Vladimir, Yur'evets, FGBI "ARRIAH"  
**Publisher:** 000 "Da Vinci Media", 121069, Moscow, Povarskaya st., 31/29, Facility VI, Room 13  
**Editorial Board Office:** 600901, Vladimir, Yur'evets, FGBI "ARRIAH"

**Типография:**  
000 «Полиграфический комплекс»,  
123298 г. Москва, ул. 3-я Хорошевская, д. 18, корп. 1

Подписано в печать 19 декабря 2019 года  
Дата выхода в свет: 27.12.2019

**Printing Office:**  
000 "Poligraficheskyy Komplex"  
123298 Moscow, 3-ya Khoroshevskaya ul. 18, build. 1

Approved for print 19 december 2019  
Issued: 27.12.2019

# СОДЕРЖАНИЕ

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

**3** Г. С. Скитович, К. В. Серова, Н. Б. Шадрова, О. В. Прунтова  
ВЫЯВЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ *CAMPYLOBACTER* SPP. С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

**13** И. В. Бородкина  
БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИЗОЛЯТОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МОЛОКА И МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРОИЗВЕДЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ КРЫМ

**25** С. Е. Шмайхель, Н. Б. Шадрова, Е. С. Ерофеева, С. И. Данильченко  
СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ИЗОЛЯТОВ БАКТЕРИЙ РОДА *SALMONELLA*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ СЫРЬЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БОЛЕЗНИ КРС

**31** В. В. Кирпиченко, С. В. Кононова, А. В. Кононов, О. П. Бьядовская, Б. Л. Манин, А. В. Спрыгин  
КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ВИРУСА РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ШТАММА «АБ 1908»

**37** А. Н. Балашов, Д. А. Лозовой, А. В. Борисов, Д. В. Михалишин, М. И. Доронин  
ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ИНАКТИВИРОВАННЫХ АНТИРАБИЧЕСКИХ ВАКЦИН ИЗ ШТАММА «ВНИИЗЖ» С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗНЫХ АДЬЮВАНТОВ

**43** Н. А. Кирсанова, А. В. Сухоедова, М. А. Плещачева, И. В. Солтынская, И. А. Тимофеева, О. В. Прасолова, Е. В. Крылова  
МЕТОД ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ: ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БОЛЕЗНИ ПТИЦ

**49** Н. Г. Зиняков, О. С. Осипова, П. Б. Акшолова, В. Ю. Сосипаторова, А. В. Андриясов, Д. Б. Андрейчук, И. А. Чвала  
АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИЗОЛЯТА ВИРУСА ГРИППА A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2, ВЫДЕЛЕННОГО НА ТЕРРИТОРИИ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | ОБЩИЕ ВОПРОСЫ

**54** А. В. Бельчихина, М. А. Шибаев, И. М. Клиновикская, А. К. Караулов  
СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ УТИЛИЗАЦИИ И УНИЧТОЖЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОТХОДОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В СУБЪЕКТАХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**61** И. М. Клиновикская, М. А. Шибаев, А. В. Бельчихина, А. К. Караулов  
СТРУКТУРА И ДВИЖЕНИЕ КАДРОВ ГОСУДАРСТВЕННОЙ ВЕТЕРИНАРНОЙ СЛУЖБЫ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

## НОВОСТИ

**67** ПРЕСС-РЕЛИЗ ФАО: «СОЗДАНИЕ В ЦЕНТРАЛЬНО-АЗИАТСКОМ РЕГИОНЕ СЕТИ ПО ОХРАНЕ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»

# CONTENTS

## ORIGINAL ARTICLES | VETERINARY MICROBIOLOGY

**8** G. S. Skitovich, K. V. Serova, N. B. Shadrova, O. V. Pruntova  
DETECTION OF *CAMPYLOBACTER* SPP. WITH REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

**19** I. V. Borodkina  
BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATES RECOVERED FROM MILK AND DAIRY PRODUCTS MANUFACTURED IN THE REPUBLIC OF CRIMEA

**25** S. Ye. Shmaykhel, N. B. Shadrova, Ye. S. Yerofeyeva, S. I. Danilchenko  
SEROLOGICAL CHARACTERISTICS AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *SALMONELLA* ISOLATES, RECOVERED FROM ANIMAL RAW MATERIAL

## ORIGINAL ARTICLES | BOVINE DISEASES

**31** V. V. Kirpichenko, S. V. Kononova, A. V. Kononov, O. P. Byadovskaya, B. L. Manin, A. V. Sprygin  
CULTURAL PROPERTIES OF BOVINE RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS STRAIN AB1908

**37** A. N. Balashov, D. A. Lozovoy, A. V. Borisov, D. V. Mikhailishin, M. I. Doronin  
ASSESSMENT OF EFFICACY AND SAFETY OF INACTIVATED RABIES VACCINES BASED ON “ARRIAH” STRAIN AND FORMULATED WITH DIFFERENT ADJUVANTS IN CATTLE

**43** N. A. Kirsanova, A. V. Sukhoedova, M. A. Pleskacheva, I. V. Soltynskaya, I. A. Timofeeva, O. V. Prasolova, E. V. Krylova  
PYROSEQUENCING: ITS POTENTIAL AND LIMITATIONS IN DIAGNOSIS OF INHERITED DISEASES IN CATTLE

## ORIGINAL ARTICLES | AVIAN DISEASES

**49** N. G. Zinyakov, O. S. Osipova, P. B. Akshalova, V. Yu. Sosipatorova, A. V. Andriyasov, D. B. Andreychuk, I. A. Chvala  
ANALYSIS OF GENETIC CHARACTERISTICS OF INFLUENZA VIRUS A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 ISOLATED IN CHELYABINSK OBLAST

## ORIGINAL ARTICLES | GENERAL ISSUES

**54** A. V. Belchikhina, M. A. Shibayev, I. M. Klinovitskaya, A. K. Karaulov  
THE STATE OF ANIMAL WASTE RENDERING AND DISPOSING SYSTEM IN THE SUBJECTS OF THE RUSSIAN FEDERATION

**61** I. M. Klinovitskaya, M. A. Shibayev, A. V. Belchikhina, A. K. Karaulov  
STRUCTURE AND STAFF MOVEMENT WITHIN STATE VETERINARY SERVICE OF RUSSIAN FEDERATION

## NEWS

**67** FAO PRESS RELEASE: “ESTABLISHMENT OF A CENTRAL ASIAN ANIMAL HEALTH NETWORK (CAAHN)”

# ВЫЯВЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ *CAMPYLOBACTER* SPP. С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Г. С. Скитович<sup>1</sup>, К. В. Серова<sup>2</sup>, Н. Б. Шадрова<sup>3</sup>, О. В. Прунтова<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: skitovich@arriah.ru; ORCID ID 0000-0003-0714-3912

<sup>2</sup> Ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: serova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-1747-2528

<sup>3</sup> Заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: shadrova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-7510-1269

<sup>4</sup> Главный эксперт, доктор биологических наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: pruntova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0003-3143-7339

## РЕЗЮМЕ

Бактерии рода *Campylobacter* — одни из основных зоонозных патогенов, вызывающих заболевания человека и животных. Кампилобактерии являются микроаэрофилами, поэтому для роста им требуется низкая концентрация кислорода (3–5%) и высокая концентрация диоксида углерода (3–10%). В качестве источника энергии они используют не углеводы, а аминокислоты. Классические бактериологические методы выявления бактерий рода *Campylobacter* не всегда являются успешными из-за сложности обеспечения оптимальных условий для их роста. В связи с этим разработка и внедрение в практику молекулярных методов обнаружения и идентификации *Campylobacter* является актуальной задачей. Была оптимизирована методика качественного обнаружения генома бактерий *Campylobacter* spp. посредством полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием термоциклера CFX-96. Мишенью амплификации был выбран высокоспецифичный участок гена 16S рРНК, позволяющий определить шесть видов кампилобактерий: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus* и *C. hyointestinalis*. Подобрана оптимальная концентрация ионов магния (2,5 мМ) и температура отжига праймеров (58 °С). Было протестировано 18 референтных штаммов различных бактерий. Положительный результат был показан только со штаммами, относящимися к роду *Campylobacter*. Чувствительность метода составила 40 молекул-мишеней. С использованием данной методики исследовали 76 проб сырья животного происхождения. Геном *Campylobacter* spp. был обнаружен в 18 образцах. Полученные результаты показывают, что оптимизированный вариант полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, основанный на амплификации гена 16S рРНК, представляет собой специфичный, чувствительный, быстрый, воспроизводимый и точный метод для качественного обнаружения *Campylobacter* spp. в пробах сырья животного происхождения.

Ключевые слова: *Campylobacter* spp., полимеразная цепная реакция в реальном времени, сырье животного происхождения.

## ВВЕДЕНИЕ

Бактерии рода *Campylobacter* являются возбудителями инфекционных болезней, проявляющихся у млекопитающих абортными, временным бесплодием, задержанием последа, вагинитами, метритами, рождением нежизнеспособного молодняка, а у кур — снижением прироста массы бройлеров, яйценоскости кур-несушек и падежом цыплят. Кроме того, эти бактерии являются одной из основных причин гастроэнтерита у людей [9, 15, 19].

По состоянию на 2014 г. род *Campylobacter* включал 26 видов и 9 подвидов [12]. Примерно половина из них — известные патогены млекопитающих, хотя заболевание человека в основном связано с *C. jejuni* и *C. coli*. Имеются данные, свидетельствующие о том, что другие *Campylobacter* spp., такие как *C. concisus*, *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis*, *C. fetus*, *C. curvas* и *C. lari*, могут также вызывать заболевания у людей [8, 21]. Заболеваемость кампилобактериозом постепенно увеличивается, и *Campylobacter* в настоящее время считается ведущей причиной бактериального гастроэнтерита во всем мире [5, 14, 25]. Считается, что около 90% диарейных заболеваний вызваны *Campylobacter* spp. [23]. Ежегодно в странах Европейского союза отмечается 9,2 млн случаев кампилобактериоза [10] и 1 млн случаев — в США [13]. В 2015 г. в Австралии было зарегистрировано 22 564 случая инфекций, вызванных бактериями рода *Campylobacter* [26].

Методы лабораторной диагностики кампилобактериоза и производственного бактериологического контроля продуктов животноводства основаны на выделении чистой культуры возбудителя из биологического материала животных посредством посевов на кровяной или эритроцитный агар с железом-сульфитом-пируватными добавками. Все этапы инкубации посевов *Campylobacter* spp. осуществляются в микроаэрофильных условиях. Для видовой дифференцировки кампилобактеры культивируют при различных температурных режимах [1, 2].

Рутинное выявление кампилобактерий микробиологическим методом с использованием селективного обогащения для уменьшения роста фоновой микрофлоры с последующей биохимической идентификацией в первую очередь направлены на обнаружение *C. jejuni* и *C. coli*. Другие патогенные представители *Campylobacter* spp. имеют дополнительные требования к условиям культивирования. Например, *C. concisus* является медленно растущим организмом, который требует наличия обогащенной водородом атмосферы. Если оптимальные условия роста не соблюдаются, то выделить искомым микроорганизм на питательной среде невозможно [16]. Недостаточная чувствительность методов культивирования, медленная скорость

роста бактерий и ошибочная идентификация стандартными фенотипическими методами могут привести к ложноотрицательным результатам. Следовательно, существует потребность в альтернативных ускоренных, чувствительных методах обнаружения *Campylobacter*, к числу которых относится полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) [18, 20, 22].

Ускоренные методы позволяют существенно сократить (на 24–48 ч) продолжительность исследований. Обладая высокой специфичностью, они обеспечивают надежное выявление *Campylobacter* в анализируемом материале [11, 27].

Целью работы была оптимизация методики выявления генома *Campylobacter* spp. посредством ПЦР-РВ в образцах продуктов животного происхождения и биологическом материале от животных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Выделение ДНК.** Бактериальную ДНК выделяли с помощью набора «Сорб-ГМО-А» (ООО «Синтол», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

**Олигонуклеотиды.** Праймеры и зонды, кодирующие последовательность гена 16S рНК для идентификации кампилобактерий, используемые в данной работе и описанные ранее М. Lund и соавт. [8], были синтезированы ООО «Синтол» (Россия). Первичные структуры олигонуклеотидов представлены в таблице 1.

**Условия проведения ПЦР-РВ.** Для постановки ПЦР использовали «Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ» производства ООО «Синтол» (Россия). Реакционную смесь собирали из следующих компонентов в расчете на одну пробу объемом 25 мкл: 5 мкл ДНК; 10× ПЦР-буфера; 2,5 мкл 2,5 мМ dNTP; 2,5 мкл 25 мМ MgCl<sub>2</sub>; по 0,3 пкМ прямого и обратного праймеров; 0,15 пкМ зонда; 2,5 Е Syntaq ДНК-полимеразы.

В качестве положительного контроля использовали ДНК, выделенную из суспензии референтного штамма *C. jejuni* ATCC 29428 с оптической плотностью 0,5 ед. по стандарту МакФарланда, что соответствует  $1 \times 10^8$  КОЕ/см<sup>3</sup>. Суспензию готовили с применением 0,9%-го раствора NaCl. В качестве отрицательного контроля использовали бидистиллированную воду.

Амплификацию в режиме реального времени проводили на термоциклере CFX-96 (Bio-Rad, США) при условиях: прогрев смеси при 50 °С 2 мин; активация фермента при 95 °С 10 мин; 45 циклов – 95 °С 15 с, 58 °С 1 мин. Результаты интерпретировали по наличию или отсутствию значения порогового цикла Ct. Пробу считали положительной при Ct ≤ 40.

**Определение аналитической чувствительности тест-системы ПЦР-РВ** проводили, используя серии 10-кратных разведений бактериальной ДНК, выделенной из суспензии референтного штамма *C. jejuni*

ATCC 33291 с оптической плотностью 1 ед. по стандарту МакФарланда, что соответствует  $3 \times 10^8$  КОЕ/см<sup>3</sup>. Суспензию готовили с использованием 0,9%-го раствора NaCl. Концентрацию микроорганизмов подтверждали методом титрования на плотной питательной среде – колумбийском агаре (HiMedia, Индия) с добавлением 5% дефибрированной крови барана. Концентрацию выделенной ДНК определяли с использованием спектрофотометра Implen NanoPhotometer P-Class P-360 (Implen, Германия). Разведения ДНК готовили с использованием буфера TE в объеме 100 мкл.

**Образцы.** В работе использовали 76 образцов сырья животного происхождения, поступивших на исследование в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2017–2018 гг. Образцы представляли следующие группы: птица – 13 проб; полуфабрикаты куриные – 25 проб; молоко коровье сырое – 33 пробы; кровь птицы – 4 пробы; смыв с подстилки – 1 проба.

**Подготовка образцов к исследованию.** Навеску продукта массой 10 г или объемом 10 см<sup>3</sup>, подготовленную для исследования, вносили в 90 см<sup>3</sup> среды для первичного обогащения *Campylobacter* (питательный бульон Болтона производства ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Посевы инкубировали в анаэробных условиях при температуре 37 °С в течение 4–6 ч, затем при температуре 41,5 °С в течение (44 ± 4) ч. После этапа первичного обогащения содержимое посевов перемешивали и из средней части отбирали по 250 мкл суспензии в полипропиленовые пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл и затем исследовали в ПЦР-РВ.

Для оценки специфичности праймеров использовали референтные штаммы, полученные из Американской коллекции типовых культур (ATCC): *Campylobacter jejuni* ATCC 33291; *Campylobacter coli* ATCC 43478; *Campylobacter lary* ATCC 35221; *Listeria monocytogenes* ATCC 19115; *Listeria innocua* ATCC 33090; *Listeria ivanovii* ATCC 19119; *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Bacillus cereus* ATCC 11778; *Enterococcus faecalis* ATCC 19433; *Rodococcus equi* ATCC 6939; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P; *Salmonella typhimurium* ATCC 14028; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Shigella flexneri* ATCC 12022; *Shigella sonnei* ATCC 11060; *Proteus mirabilis* ATCC 29906; *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610.

Для роста референтных нецелевых штаммов использовали колумбийский агар (HiMedia, Индия) и инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 ч. Референтные штаммы *Campylobacter* выращивали на колумбийском агаре (HiMedia, Индия) с добавлением 5% дефибрированной крови барана и инкубировали при 37 °С в течение 24 ч в микроаэробных условиях (CO<sub>2</sub> – 10%, O<sub>2</sub> – 5%, N<sub>2</sub> – 85%) согласно МУК 4.2.2321-08. Для достижения данных условий использовали газогенерирующие пакеты «Кампилогаз» («ИНКО», Россия).

Для исследования в ПЦР-РВ готовили суспензии референтных штаммов с плотностью 0,5 ед. по стандарту МакФарланда. Плотность измеряли с использованием денситометра (BioMerieux, Франция), а также подтверждали количеством жизнеспособных бактерий методом 10-кратных разведений культур на чашках с колумбийским агаром, с добавлением для кампилобактерий 5% дефибрированной крови барана (HiMedia, Индия).

**Статистическая обработка данных.** Для статистической обработки полученных результатов и постро-

**Таблица 1**  
Нуклеотидные последовательности праймеров и зонда для обнаружения участка генома *Campylobacter* spp.

| Наименование |          | Последовательность (5'–3')        |
|--------------|----------|-----------------------------------|
| camp2        | Forward: | CACGTGCTACAATGGCATAT              |
|              | Reverse: | GGCTTCATGCTCTCGAGTT               |
|              | Probe:   | FAM-CAGAGAACAATCCGAAGTGGGACA-RTQ1 |

ения кривой линейной регрессии провели три повторных эксперимента с 10-кратными разведениями геномной ДНК. Эффективность амплификации рассчитали по формуле:  $E = (10^{\text{slope}} - 1) \times 100\%$ , где  $10^{\text{slope}}$  – коэффициент наклона. Результаты ПЦР-РВ анализировали с помощью программного обеспечения системы v3.1 (CFX Manager Software).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам анализа литературных данных были выбраны последовательности, кодирующие участок гена 16S рРНК (табл. 1) [8]. Указанные праймеры идентифицируют четыре вида термофильных кампилобактерий: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, которые в основном встречаются в организме домашней птицы и являются патогенными для человека [4, 17]. Кроме того, с помощью данных праймеров идентифицируют *C. helveticus* и *C. hyointestinalis*, первую из которых обнаруживают в основном у кошек и собак [6], вторая распространена среди свиней [7].

Оптимизация ПЦР-РВ для обнаружения бактерий *Campylobacter* spp. включала определение точной температуры отжига праймеров и концентрации ионов магния, при которых отмечали наивысшую интенсивность ответного флуоресцентного сигнала при высокой специфичности. Оптимальная температура отжига определяется структурой праймеров [3]. В результате проведенных расчетов по формуле:  $T_m (^{\circ}\text{C}) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$ , где  $T_m$  – температура отжига; А, Т, С, G – нуклеотидные основания, температура отжига для прямого и обратного праймеров составила 58 °С, температура отжига зонда – 72 °С. Для определения оптимальной температуры проводили реакции ПЦР-РВ в градиенте  $\pm 10$  °С от вычисленной температуры отжига праймеров. Наилучшие результаты были получены для температуры 58 °С.

При определении концентрации ионов магния использовали ПЦР-смеси с концентрациями от 2 до 6 мМ с шагом 0,5 мМ. В результате проведенных исследований была выбрана концентрация 2,5 мМ.

Оптимальные условия, которые показывают наименьшее значение порогового цикла ( $C_t$ ) с наименьшими концентрациями праймеров и зонда, указаны в материалах и методах.

**Аналитическая чувствительность.** Для оценки аналитической чувствительности метода использовали ДНК, выделенную из суспензии контрольного штамма *C. jejuni* ATCC 33291 с оптической плотностью 1 ед. по стандарту МакФарланда, что соответствует  $3 \times 10^8$  КОЕ/см<sup>3</sup>. Концентрация ДНК была измерена с помощью нанофотометра IMPLENP-classP-360 (Германия) и составила 12,4 нг/мкл.

В соответствии со средним размером генома различных исследуемых микроорганизмов 1 нг геномной ДНК соответствует как минимум  $3 \times 10^5$  клеткам [24]. Таким образом, концентрация ДНК 12,4 нг/мкл соответствует приблизительно  $4 \times 10^6$  бактериальным клеткам в 1 мкл. Выделенную ДНК разводили буфером ТЕ с шагом 10 и проводили реакцию амплификации в трех повторностях со следующими количествами бактериальных клеток в образцах:  $4 \times 10^5$ ;  $4 \times 10^4$ ;  $4 \times 10^3$ ;  $4 \times 10^2$ ; 40; 4; 0,4 (рис. 1).

Для каждого разведения (3 повторности) рассчитывали среднее значение  $C_t$  и стандартное отклонение ( $\pm SD$ ) (табл. 2).

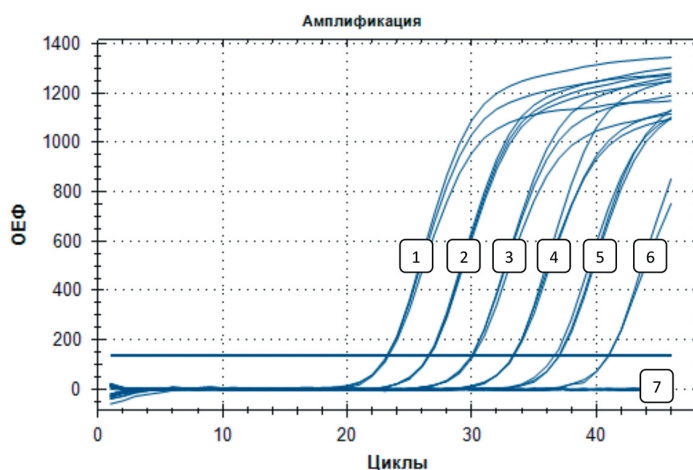


Рис. 1. График накопления флуоресцентного сигнала при выявлении генома *Campylobacter* spp. в ПЦР-РВ ( $n = 3$ )

Концентрация бактериальных клеток:

1 –  $4 \times 10^5$ ; 2 –  $4 \times 10^4$ ; 3 –  $4 \times 10^3$ ; 4 –  $4 \times 10^2$ ; 5 – 40; 6 – 4; 7 – 0,4.

Полученные результаты показали, что участок гена 16S рРНК был амплифицирован в первых пяти разведениях вплоть до 4 копий генома *Campylobacter*.

Для оценки эффективности методики провели три повторных эксперимента и получили значения  $C_t$ , которые использовали для построения регрессионной кривой (рис. 2). Было показано, что количества ДНК-мишени линейно коррелировали со значениями  $C_t$  при коэффициенте корреляции, равном 0,9986. Используя значение угла наклона, полученного при построении кривой линейной регрессии, вычислили значение эффективности амплификации  $E = 92,26\%$ .

Регрессионный анализ подтверждает линейность полученных результатов. Эффективность амплификации ( $E = 92,26\%$ ) и коэффициент корреляции ( $R^2 = 0,9986$ ) показывают, что оптимизированная методика обеспечивает высокоточное определение *Campylobacter* spp.

**Определение специфичности.** Чтобы оценить специфичность анализа ПЦР-РВ, проверили на перекрестную реактивность ДНК, выделенную из 18 видов бактерий, в том числе трех целевых (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*) и 15 нецелевых штаммов (рис. 3).

Значения флуоресценции красителя FAM позволили однозначно идентифицировать все штаммы, принадлежащие к роду *Campylobacter*, тогда как флуоресценции для нецелевых штаммов не наблюдалось. Эти результаты доказывают, что оптимизированная методика является высокоспецифичной. Для успешного применения методики крайне важно, чтобы специфичная для видов *Campylobacter* реакция была одинаково эффективной. Анализ профилей флуоресценции, полученных при исследовании специфичности, показал, что значения  $C_t$  были близкими по значению и не зависели от конкретных видов *Campylobacter* (средние значения  $C_t 21,39 \pm 0,74$ ) (рис. 3).

Таким образом, предложенная методика проведения ПЦР-РВ позволяет специфично определять целевые штаммы рода *Campylobacter*.

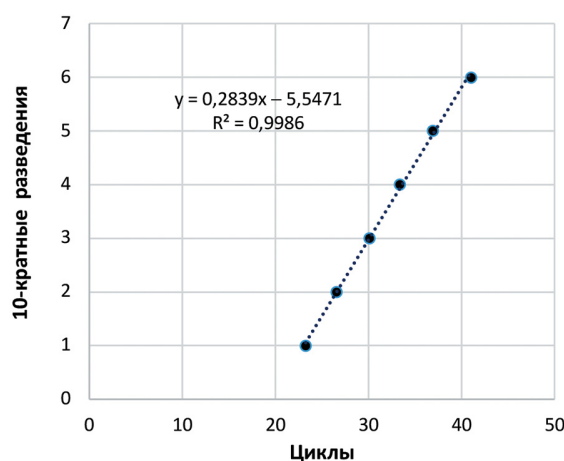
**Выявление генома бактерий *Campylobacter* spp. в сырье животного происхождения.** С использованием оптимизированной методики ПЦР-РВ исследовали 76 проб сырья животного происхождения (табл. 3).

**Таблица 2**  
Значения Ct при выявлении генома *Campylobacter* spp. в ПЦР-РВ ( $n = 3$ )

| № п/п | Концентрация бактериальных клеток | Конечные ОЕФ | Значение Ct | Среднее значение Ct | Стандартное отклонение $\pm SD$ | Результат         |
|-------|-----------------------------------|--------------|-------------|---------------------|---------------------------------|-------------------|
| 1     | $4 \times 10^5$                   | 1163         | 23,34       | 23,26               | 0,072                           | (+) положительный |
| 2     |                                   | 1337         | 23,24       |                     |                                 | (+) положительный |
| 3     |                                   | 1269         | 23,20       |                     |                                 | (+) положительный |
| 4     | $4 \times 10^4$                   | 1234         | 26,62       | 26,57               | 0,051                           | (+) положительный |
| 5     |                                   | 1262         | 26,59       |                     |                                 | (+) положительный |
| 6     |                                   | 1286         | 26,52       |                     |                                 | (+) положительный |
| 7     | $4 \times 10^3$                   | 1244         | 30,03       | 30,07               | 0,058                           | (+) положительный |
| 8     |                                   | 1171         | 30,05       |                     |                                 | (+) положительный |
| 9     |                                   | 1096         | 30,14       |                     |                                 | (+) положительный |
| 10    | $4 \times 10^2$                   | 1093         | 33,40       | 33,35               | 0,044                           | (+) положительный |
| 11    |                                   | 1065         | 33,32       |                     |                                 | (+) положительный |
| 12    |                                   | 1216         | 33,33       |                     |                                 | (+) положительный |
| 13    | 40                                | 1011         | 37,02       | 36,91               | 0,226                           | (+) положительный |
| 14    |                                   | 980          | 37,06       |                     |                                 | (+) положительный |
| 15    |                                   | 1004         | 36,65       |                     |                                 | (+) положительный |
| 16    | 4                                 | -0,668       | н/о         | 41,02               | 0,035                           | (-) отрицательный |
| 17    |                                   | 549          | 41,04       |                     |                                 | (-) отрицательный |
| 18    |                                   | 501          | 40,99       |                     |                                 | (-) отрицательный |
| 19    | 0,4                               | -0,666       | н/о         | -                   | -                               | (-) отрицательный |
| 20    |                                   | -1,05        | н/о         |                     |                                 | (-) отрицательный |
| 21    |                                   | -3,75        | н/о         |                     |                                 | (-) отрицательный |

н/о – не обнаружено.

Геном *Campylobacter* spp. был обнаружен в 18 образцах. Наибольшее количество положительных проб наблюдали при исследовании полуфабрикатов куриных (44,0%). Также геном кампилобактерий выявили в тушках птицы (23,1%), крови птицы (25,0%), сыром молоке (9,1%).



**Рис. 2.** График линейной регрессии Ct при тестировании 10-кратных разведений ДНК *Campylobacter* spp. в ПЦР-РВ

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований была оптимизирована методика, позволяющая выявлять геном *Campylobacter* spp. при наличии приблизительно 40 молекул-мишеней в исследуемом образце. Оптимизированы условия проведения ПЦР-РВ: подобрана оптимальная концентрация магния (2,5 мМ) и температура отжига праймеров (58 °C). Установлено, что выбранные праймеры обладают высокой специфичностью и не дают ложноположительных реакций. Показано, что данная методика обеспечивает точное определение *Campylobacter* spp. (значение  $R^2$  выше 0,99) с эффективностью ПЦР 92,26%.

Методика апробирована в испытаниях 76 образцов сырья животного происхождения (образцы куриной продукции, молоко коровье сырое, биоматериалы куриные). Результаты исследований позволяют сделать заключение о том, что методика является высокоспецифичной, чувствительной и обеспечивает определение *Campylobacter* spp. в исследуемых образцах.

Таким образом, предложенная методика может использоваться в качестве экспресс-метода в дополнение к классическим методам, используемым в рутинном анализе в микробиологических лабораториях. Кроме того, данную методику можно применять при

оценке распространенности *Campylobacter* spp. в пищевой промышленности, а также в сырых и обработанных продуктах животного происхождения.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Минаев В. И., Черкасский Б. Л., Минаева Н. З. Лабораторная диагностика кампилобактериоза в современных условиях // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1991. – № 8. – С. 18–21.
- Питательная среда для выделения и культивирования кампилобактерий / З. У. Темирганова, П. Ш. Гашимова, Н. В. Сафонова [и др.] // Микробиология. – 1999. – № 6. – С. 27–30.
- Рекомендации по постановке ПЦР / Евроген. – вер. 18 сентября 2017 г. – URL: <http://evrogen.ru/kit-user-manuals/Evrogen-PCR-recommendation.pdf>.
- A one-year study of *Campylobacter* carriage by individual Danish broiler chickens as the basis for selection of *Campylobacter* spp. strains for a chicken infection model / D. D. Bang, E. M. Nielsen, K. Knudsen, M. Madsen // Epidemiol. Infect. – 2003. – Vol. 130 (2). – P. 323–333; DOI: 10.1017/S095026880200821x.
- Bronowski C., James C. E., Winstanley C. Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni* // FEMS Microbiol. Lett. – 2014. – Vol. 356 (1). – P. 8–19; DOI: 10.1111/1574-6968.12488.
- Campylobacter helveticus* sp. nov., a new thermophilic species from domestic animals: characterization, and cloning of a species-specific DNA probe / J. Stanley, A. P. Burnens, D. Linton [et al.] // J. Gen. Microbiol. – 1992. – Vol. 138 (11). – P. 2293–2303; DOI: 10.1099/00221287-138-11-2293.
- Campylobacter hyointestinalis* subsp. *lawsonii* subsp. nov., isolated from the porcine stomach, and an emended description of *Campylobacter hyointestinalis* / S. L. On, B. Bloch, B. Holmes [et al.] // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1995. – Vol. 45 (4). – P. 767–774; DOI: 10.1099/0020713-45-4-767.
- Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by real-time PCR / M. Lund, S. Nordentoft, K. Pedersen, M. Madsen // J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol. 42 (11). – P. 5125–5132; DOI: 10.1128/JCM.42.11.5125-5132.2004.
- Diversity of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated in laboratory animals / N. S. Taylor, M. A. Ellenberger, P. I. Wu, J. G. Fox // Lab. Anim. Sci. – 1989. – Vol. 39 (30). – P. 219–221; PMID: 2724920.
- Estimating the true incidence of campylobacteriosis and salmonellosis in the European Union, 2009 / A. H. Havelaar, S. Ivarsson, M. Löfdahl, M. J. Nauta // Epidemiol. Infect. – 2013. – Vol. 141 (2). – P. 293–302; DOI: 10.1017/S0950268812000568.
- Evaluation of a *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* realtime quantitative polymerase chain reaction for direct analysis of bovine preputial samples / B. Chaban, S. Chu, S. Hendrick [et al.] // Can. J. Vet. Res. – 2012. – Vol. 76 (3). – P. 166–173; PMID: PMC3384278.
- Fitzgerald C. *Campylobacter* // Clin. Lab. Med. – 2015. – Vol. 35 (2). – P. 289–298; DOI: 10.1016/j.cll.2015.03.001.
- Foodborne illness acquired in the United States – Major pathogens / E. Scallan, R. M. Hoekstra, F. J. Angulo [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2011. – Vol. 17 (1). – P. 7–15; DOI: 10.3201/eid1701.P11101.
- Global epidemiology of *Campylobacter* infection / N. O. Kaakoush, N. Castaño-Rodríguez, H. M. Mitchell, S. M. Man // Clin. Microbiol. Rev. – 2015. – Vol. 28 (3). – P. 687–720; DOI: 10.1128/CMR.00006-15.
- Humphrey T., O'Brien S., Madsen M. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: A food production perspective // Int. J. Food Microbiol. – 2007. – Vol. 117 (3). – P. 237–257; DOI: 10.1016/j.jfoodmicro.2007.01.006.
- Huq M., Gonis G., Istivan T. Development and evaluation of a multiplex PCR for the detection of *Campylobacter concisus* and other *Campylobacter* spp. from gastroenteritis cases // Open J. Med. Microbiol. – 2014. – Vol. 4 (1). – P. 29–37; DOI: 10.4236/ojmm.2014.41005.
- Identification of *Campylobacter* isolated from Danish broilers by phenotypic tests and species-specific PCR assays / M. Wainø, D. D. Bang, M. Lund [et al.] // J. Appl. Microbiol. – 2003. – Vol. 95 (4). – P. 649–655; DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.01996.x.
- Identification of hyperinvasive *Campylobacter jejuni* strains isolated from poultry and human clinical sources / C. Fearnley, G. Manning, M. Bagnall [et al.] // J. Med. Microbiol. – 2008. – Vol. 57 (5). – P. 570–580; DOI: 10.1099/jmm.0.47803-0.
- Infectious agent and immune response characteristics of chronic enterocolitis in captive rhesus macaques / K. Sestak, C. K. Merritt, J. Borda [et al.] // Infect. Immun. – 2003. – Vol. 71 (7). – P. 4079–4086; DOI: 10.1128/iai.71.7.4079-4086.2003.
- Lehtola M. J., Loades C. J., Keevil C. W. Advantages of peptide nucleic acid oligonucleotides for sensitive site directed 16S rRNA fluorescence in

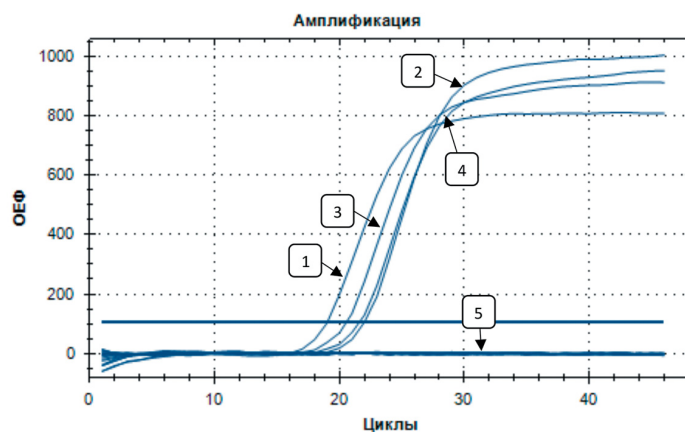


Рис. 3. Определение специфичности ПЦР-РВ при идентификации генома *Campylobacter* spp.

- 1 – положительный контроль;  
2 – *Campylobacter jejuni* ATCC 33291;  
3 – *Campylobacter coli* ATCC 43478;  
4 – *Campylobacter lari* ATCC 35221;  
5 – нецелевые штаммы.

Таблица 3

Выявление генома *Campylobacter* spp. в образцах сырья животного происхождения посредством ПЦР-РВ

| Номер группы | Наименование образца  | Количество проб |               |      |
|--------------|-----------------------|-----------------|---------------|------|
|              |                       | всего           | положительных | %    |
| 1            | Полуфабрикаты куриные | 25              | 11            | 44,0 |
| 2            | Птица                 | 13              | 3             | 23,1 |
| 3            | Молоко коровье сырое  | 33              | 3             | 9,1  |
| 4            | Кровь птицы           | 4               | 1             | 25,0 |
| 5            | Смыв с подстилки      | 1               | 0             | 0    |
| Итого        |                       | 76              | 18            | 23,7 |

situ hybridization (FISH) detection of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari* // J. Microbiol. Methods. – 2005. – Vol. 62 (2). – P. 211–219; DOI: 10.1016/j.mimet.2005.02.009.

21. Man S. M. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. – 2011. – Vol. 8 (12). – P. 669–685; DOI: 10.1038/nrgastro.2011.191.

22. New methods for detection of campylobacters in stool samples in comparison to culture / E. Bessede, A. Delcamp, E. Sifré [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2011. – Vol. 49 (3). – P. 941–944; DOI: 10.1128/JCM.01489-10.

23. Pitkänen T. Review of *Campylobacter* spp. in drinking and environmental waters // J. Microbiol. Methods. – 2013. – Vol. 95 (1). – P. 39–47; DOI: 10.1016/j.mimet.2013.06.008.

24. Rodrigues-Lazaro D., Hernandez M., Pla M. Simultaneous quantitative detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* using a duplex real-time PCR-based assay // FEMS Microbiol. Lett. – 2004. – Vol. 233 (2). – P. 257–267; DOI: 10.1016/j.femsle.2004.02.018.

25. The role of environmental reservoirs in human campylobacteriosis / H. Whitley, B. van den Akker, S. Giglio, R. Bentham // Int. J. Environ. Res. Public Health. – 2013. – Vol. 10 (11). – P. 5886–5907; DOI: 10.3390/ijerph10115886.

26. Whitley H., McLean R., Ross K. Detection of *Campylobacter jejuni* in Lizard faeces from central Australia using quantitative PCR // Pathogens. – 2017. – Vol. 6 (1):1; DOI: 10.3390/pathogens6010001.

27. Winters D. K., O'Leary A. E., Slavik M. F. Polymerase chain reaction for rapid detection of *Campylobacter jejuni* in artificially contaminated foods // Lett. Appl. Microbiol. – 1998. – Vol. 27 (3). – P. 163–167; DOI: 10.1046/j.1472-765x.1998.00411.x.

Поступила 27.05.19  
Принята в печать 30.10.19

# DETECTION OF *CAMPYLOBACTER* SPP. WITH REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

G. S. Skitovich<sup>1</sup>, K. V. Serova<sup>2</sup>, N. B. Shadrova<sup>3</sup>, O. V. Pruntova<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: skitovich@arriah.ru; ORCID ID 0000-0003-0714-3912

<sup>2</sup> Leading Veterinarian, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: serova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-1747-2528

<sup>3</sup> Head of Laboratory, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: shadrova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-7510-1269

<sup>4</sup> Chief Expert, Doctor of Science (Biology), Professor, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: pruntova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0003-3143-7339

## SUMMARY

Bacteria of *Campylobacter* genus are ones of the main zoonotic pathogens causing human and animal diseases. *Campylobacter* organisms are microaerophiles and, therefore, require low oxygen concentration (3–5%) and high carbon dioxide concentration (3–10%) for their growth. They use amino acids rather than carbons as a source of energy. Classical bacteriological methods for *Campylobacter* spp. detection are not always successful due to difficulties in creating optimal conditions for their growth. Therewith, development and implementation of molecular methods for *Campylobacter* detection and identification are of current importance. Assay for qualitative *Campylobacter* spp. detection with real-time polymerase chain reaction using CFX-96 thermocycler was optimized. Highly specific segment of 16S rRNA gene allowing identification of 6 *Campylobacter* species: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus* и *C. hyointestinalis* was selected as an amplification target. Optimal magnesium ion concentration (2.5 mM) and primer annealing temperature (58 °C) were determined. Eighteen reference strains of various bacteria were tested. Only tests of *Campylobacter* genus strains gave positive results. The method sensitivity was 40 target molecules. The said method was used for testing 76 samples of raw materials of animal origin. *Campylobacter* spp. genome was detected in 18 samples. Obtained results showed that the optimized variant of real-time polymerase chain reaction based on 16S rRNA gene amplification was a specific, sensitive, rapid, reproducible and accurate method for qualitative detection of *Campylobacter* spp. in samples of raw animal materials.

**Key words:** *Campylobacter* spp., real-time polymerase chain reaction, raw animal materials.

## INTRODUCTION

Bacteria of *Campylobacter* genus are agents of infectious diseases that manifest themselves as abortions, temporal infertility, retention of placenta, vaginitis, metritis, unviable young animals in mammals as well as decreased gain weights in broilers and decreased egg production in hens and chick mortality in chickens. Moreover, these bacteria are a major cause of gastroenteritis in humans [9, 15, 19].

As at 2014, *Campylobacter* genus included 26 species and 9 subspecies [12]. Approximately a half of them is known pathogens of mammals but human diseases are mainly associated with *C. jejuni* and *C. coli*. There is evidence that other *Campylobacter* spp., such as *C. concisus*, *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis*, *C. fetus*, *C. curvas* and *C. lari* can also cause diseases in humans [8, 21]. *Campylobacteriosis* incidence is gradually increasing and currently *Campylobacter* is considered to be a major cause of bacterial gastroenteritis worldwide [5, 14, 25]. About 90% diar-

rheic diseases are considered to be caused by *Campylobacter* spp. [23]. Annually, 9.2 mln campylobacteriosis cases are reported in the European Union member states [10] and 1 mln campylobacteriosis cases are reported in the USA [13]. In Australia 22,564 cases associated with *Campylobacter* spp. infection were reported in 2015 [26].

Methods of laboratory campylobacteriosis diagnosis and in-process bacteriological control of animal products are based on the isolation of pure culture of the agent from animal biological materials by inoculations in blood and Erythrit agar with ferrum-sulfite-piruvate additives. All stages of *Campylobacter* spp.-inoculated media incubation are performed in microaerophilic atmosphere. *Campylobacter* organisms are cultivated at different temperatures for species differentiation [1, 2].

Routine *Campylobacter* spp. detection with the method including selective enrichment for inhibiting growth of competing microflora followed by biochemical

identification is mainly aimed at *C. jejuni* and *C. coli* detection. Other pathogens of *Campylobacter* spp. require additional conditions for their cultivation. For example, *C. concisus* is a slow-growing organism that requires hydrogen-enriched atmosphere. It is impossible to isolate target organism when the optimal growth conditions are not met [16]. Insufficient sensitivity of the cultivation methods, slow bacterium growth rate and incorrect identification with standard phenotypic methods could lead to false-negative results. Consequently, alternative rapid sensitive *Campylobacter* detection methods including real-time polymerase chain reaction (rtPCR) are required [18, 20, 22].

Accelerated methods significantly reduce test time (by 24–48 hours). Being highly specific, they enable reliable *Campylobacter* detection in tested materials [11, 27].

The study was aimed at optimization of the method for *Campylobacter* spp. genome detection in samples of animal products and raw animal materials with rtPCR.

## MATERIALS AND METHODS

**DNA extraction.** Bacterial DNA was extracted with “Sorb-GMO-A” kit (OOO “Sintol”, Russia) in accordance with the manufacturer’s instruction.

**Oligonucleotides.** Primers and probes coding for 16S rRNA gene sequence for *Campylobacter* spp. identification used in the study and previously described by M. Lund et al. [8], were synthesized by the OOO “Sintol” (Russia). Oligonucleotide primary structures are presented in Table 1.

**rtPCR conditions.** rtPCR reagent kit produced by the OOO “Sintol” (Russia) was used. The reaction mixture was prepared from the following components as per sample (25 µl): 5 µl of DNA; 10× PCR-buffer; 2.5 µl of 2.5 mM dNTP; 2.5 µl of 25 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.3 pM forward primer and 0.3 pM reverse primer; 0.15 pM probe; 2.5 U of SynTaq DNA-polymerase.

DNA extracted from reference *C. jejuni* strain suspension (ATCC 29428) with optical density of 0.5 McFarland units (i.e. 1×10<sup>8</sup> CFU/cm<sup>3</sup>) was used as a positive control. The suspension was prepared using 0.9% NaCl solution. Double-distilled water was used as a negative control.

Real-time amplification was carried out using CFX-96 thermocycler (Bio-Rad, USA) under the following conditions: mixture heating at 50 °C for 2 minutes; enzyme activation at 95 °C for 10 minutes; 45 cycles – at 95 °C for 15 s, at 58 °C for 1 min. The results were interpreted based on cycle threshold (Ct) value. The sample was considered positive when Ct ≤ 40.

**Analytical sensitivity of rtPCR test system** was determined using series of 10-fold dilutions of bacterial DNA extracted from reference *C. jejuni* strain suspension (ATCC 33291) with optical density of 1 McFarland unit that was equivalent to 3×10<sup>8</sup> CFU/cm<sup>3</sup>. The suspension was prepared using 0.9% NaCl solution. Microorganism concentration was confirmed by titration onto solid nutrient medium, Columbia agar (HiMedia, India) supplemented with 5% defibrinated ram blood. Concentration of the extracted DNA was determined with Implen NanoPhotometer P-Class P-360 spectrophotometer (Implen, Germany). DNA dilutions were prepared using 100 µl of TE buffer.

**Samples.** Seventy-six samples of raw animal materials submitted for testing to the FGBI “ARRIAH” in 2017–2018 were used. The samples were classified into three groups: poultry – 13 samples; chicken meat preparations –

**Table 1**  
Nucleotide sequences of primers and probe for *Campylobacter* spp. genome segment detection

| Description |          | Sequence (5'–3')                 |
|-------------|----------|----------------------------------|
| camp2       | Forward: | CACGTGCTACATGGCATAT              |
|             | Reverse: | GGCTTCATGCTCTCGAGTT              |
|             | Probe:   | FAM-CAGAGAACATCCGAAGTGGGACA-RTQ1 |

25 samples; raw cow milk – 33 samples, poultry blood – 4 samples; litter swabs – 1 sample.

**Preparation of samples for testing.** A sample weight (10 g or 10 cm<sup>3</sup>) prepared for testing was added to 90 cm<sup>3</sup> of medium for *Campylobacter* initial enrichment (Bolton nutrient broth, produced by the FBIS “State Research Centre for Applied Microbiology and Biotechnology”, Obolensk). Inoculated medium was incubated in anaerobic atmosphere at 37 °C for 4–6 hours, and then at 41.5 °C for (44 ± 4) hours. After initial enrichment completion, the inoculated medium was mixed and 250 µl of the suspension was taken from its middle part and transferred to 1.5 ml Eppendorf polypropylene tubes, and then tested with rtPCR.

The following reference strains obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) were used for testing primers for their specificity: *Campylobacter jejuni* ATCC 33291; *Campylobacter coli* ATCC 43478; *Campylobacter lary* ATCC 35221; *Listeria monocytogenes* ATCC 19115; *Listeria innocua* ATCC 33090; *Listeria ivanovii* ATCC 19119; *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Bacillus cereus* ATCC 11778; *Enterococcus faecalis* ATCC 19433; *Rodococcus equi* ATCC 6939; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P; *Salmonella typhimurium* ATCC 14028; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Shigella flexneri* ATCC 12022; *Shigella sonnei* ATCC 11060; *Proteus mirabilis* ATCC 29906; *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610.

The non-target reference strains were grown in Columbia agar (HiMedia, India) and incubated at 37 °C for 24 hours. Reference *Campylobacter* strains were grown in Columbia agar (HiMedia, India) supplemented with 5% defibrinated ram blood and incubated at 37 °C for 24 hours in microaerobic atmosphere (CO<sub>2</sub> – 10%, O<sub>2</sub> – 5%, N<sub>2</sub> – 85%) according to the Methodical Guidelines (MG) 4.2.2321-08. Kampilogas gas generation bags (INKO, Russia) were used for creating these conditions.

Reference strains suspensions (density – 0.5 McFarland units) were used for tests with rtPCR. Density was measured with densitometer (BioMerieux, France) and confirmed by counting viable bacteria with method of 10-fold culture dilutions in plates containing Columbia agar (HiMedia, India) supplemented with 5% defibrinated ram blood for *Campylobacter* organisms.

**Statistical data processing.** Three replicate tests using 10-fold dilutions of genomic DNA were carried out for statistical processing of obtained results and linear regression curve plotting. Amplification effectiveness was calculated according to the following formula:  $E = (10^{\text{slope}} - 1) \times 100\%$ , where 10<sup>slope</sup> – slope coefficient. rtPCR results were analyzed with v3.1 system software (CFX Manager Software).

## RESULTS AND DISCUSSION

Sequences coding for 16S rRNA gene segment were selected based on the results of literature data

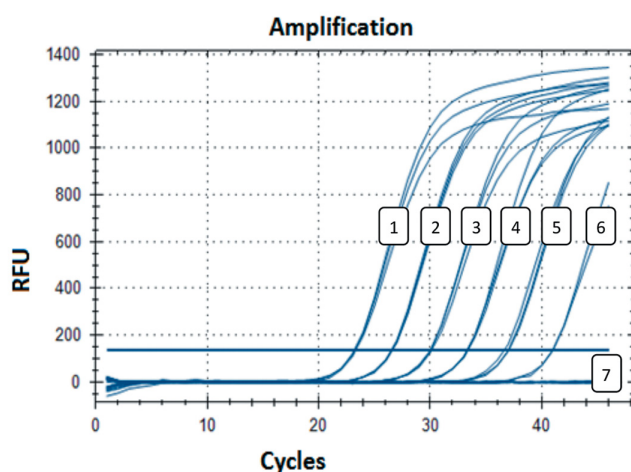


Fig. 1. Graph of fluorescent signal accumulation in case of *Campylobacter* spp. genome detection with rtPCR ( $n = 3$ )

Bacterial cell concentrations:

1 –  $4 \times 10^5$ ; 2 –  $4 \times 10^4$ ; 3 –  $4 \times 10^3$ ; 4 –  $4 \times 10^2$ ; 5 – 40; 6 – 4; 7 – 0.4.

analysis (Table 1) [8]. The said primers identify four species of thermophilic *Campylobacter* organisms: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, that mainly occur in poultry and are

pathogenic for humans [4, 17]. Moreover, these primers are used for *C. helveticus* and *C. hyointestinalis* identification, the first one mainly occurs in cats and dogs [6], the second one – in pigs [7].

Optimization of rtPCR for *Campylobacter* spp. detection included determination of primer annealing temperature and magnesium ion concentration for which the highest responsive fluorescent signal intensity was observed with high specificity. Optimal annealing temperature was determined based on the primer structure [3]. Based on calculations made according to the formula:  $T_m (^{\circ}\text{C}) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$ , where  $T_m$  – annealing temperature; A, T, C, G – nucleotide bases, annealing temperature for forward and reverse primers was 58  $^{\circ}\text{C}$ , probe annealing temperature was 72  $^{\circ}\text{C}$ . rtPCRs were carried out at calculated primer annealing temperature using a gradient of  $\pm 10^{\circ}\text{C}$ . The best results were obtained when the temperature was 58  $^{\circ}\text{C}$ .

PCR mixtures with concentrations of 2–6 mM and gradient of 0.5 mM were used for determination magnesium ion concentrations. The concentration of 2.5 mM was selected based on the test results.

Optimal conditions under which Ct value was the least at minimum primer and probe concentrations are described in Materials and Methods.

Table 2

Ct value when *Campylobacter* spp. genome was detected with rtPCR ( $n = 3$ )

| No. | Bacterial cell concentration | Final RFU | Ct value | Mean Ct value | Standard deviation, $\pm$ SD | Result       |
|-----|------------------------------|-----------|----------|---------------|------------------------------|--------------|
| 1   | $4 \times 10^5$              | 1,163     | 23.34    | 23.26         | 0.072                        | (+) positive |
| 2   |                              | 1,337     | 23.24    |               |                              | (+) positive |
| 3   |                              | 1,269     | 23.20    |               |                              | (+) positive |
| 4   | $4 \times 10^4$              | 1,234     | 26.62    | 26.57         | 0.051                        | (+) positive |
| 5   |                              | 1,262     | 26.59    |               |                              | (+) positive |
| 6   |                              | 1,286     | 26.52    |               |                              | (+) positive |
| 7   | $4 \times 10^3$              | 1,244     | 30.03    | 30.07         | 0.058                        | (+) positive |
| 8   |                              | 1,171     | 30.05    |               |                              | (+) positive |
| 9   |                              | 1,096     | 30.14    |               |                              | (+) positive |
| 10  | $4 \times 10^2$              | 1,093     | 33.40    | 33.35         | 0.044                        | (+) positive |
| 11  |                              | 1,065     | 33.32    |               |                              | (+) positive |
| 12  |                              | 1,216     | 33.33    |               |                              | (+) positive |
| 13  | 40                           | 1,011     | 37.02    | 36.91         | 0.226                        | (+) positive |
| 14  |                              | 980       | 37.06    |               |                              | (+) positive |
| 15  |                              | 1,004     | 36.65    |               |                              | (+) positive |
| 16  | 4                            | -0.668    | n/d      | 41.02         | 0.035                        | (-) negative |
| 17  |                              | 549       | 41.04    |               |                              | (-) negative |
| 18  |                              | 501       | 40.99    |               |                              | (-) negative |
| 19  | 0.4                          | -0.666    | n/d      | -             | -                            | (-) negative |
| 20  |                              | -1.05     | n/d      |               |                              | (-) negative |
| 21  |                              | -3.75     | n/d      |               |                              | (-) negative |

n/d – not detected.

**Analytical sensitivity.** DNA extracted from control *C. jejuni* strain suspension (ATCC 33291) with optical density of 1 McFarland unit that was equivalent to  $3 \times 10^8$  CFU/cm<sup>3</sup> was used for testing the method for its analytical sensitivity. DNA concentration was determined with IMPLENP-class P-360 nanophotometer (Germany) and was 12.4 ng/μl.

Considering the middle size of genomes of different tested microorganisms, one ng of genomic DNA corresponds to at least  $3 \times 10^5$  cells [24]. Thus, DNA concentration of 12.4 ng/μl corresponds to approximately  $4 \times 10^6$  bacterial cells in 1 μl. Extracted DNA was diluted with TE buffer using gradient of 10 and amplification reaction was carried out in triplicate using the following bacterial cell concentrations in the samples:  $4 \times 10^5$ ;  $4 \times 10^4$ ;  $4 \times 10^3$ ;  $4 \times 10^2$ ; 40; 4; 0.4 (Fig. 1).

Mean Ct value and standard deviation ( $\pm$ SD) were calculated for each dilution (3 replicates) (Table 2).

Obtained results showed that 16S rRNA gene fragment was amplified in the first five dilutions.

Three replicate tests were performed to assess the method performance and Ct values were derived to plot regression curve (Fig. 2). Quantities of target DNA were found to linearly correlate to Ct values at correlation coefficient of 0.9986. Slope angle value derived by plotting linear regression curve was used to determine amplification effectiveness and was  $E = 92.26\%$ .

Regression analysis indicates linearity of obtained results. Amplification effectiveness ( $E = 92.26\%$ ) and correlation coefficient ( $R^2 = 0.9986$ ) show that the optimized assay enables highly accurate *Campylobacter* spp. detection.

**Determination of specificity.** DNA isolated from 18 bacterium species including three target (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*) and 15 non-target strains were tested for its cross reactivity to determine rtPCR assay specificity (Fig. 3).

FAM fluorescence values enabled unambiguous identification of all strains belonging to *Campylobacter* genus whereas no fluorescence was observed for non-target strains. The results proved that the optimized method was highly specific. Equal effectiveness of all reactions specific for *Campylobacter* species is crucial for successful method application. Analysis of fluorescence profiles derived during specificity tests showed that Ct values were similar and did not depend on particular *Campylobacter* species (mean Ct value was  $21.39 \pm 0.74$ ) (Fig. 3).

Thus, proposed rtPCR assay enables highly specific identification of target strains of *Campylobacter* genus.

**Detection of *Campylobacter* spp. genome in raw animal materials.** Seventy-six (76) samples of raw animal materials were tested with the optimized rtPCR assay (Table 3).

*Campylobacter* spp. genome was detected in 18 samples. The highest number of positive samples (44.0%) were detected in chicken meat preparations. *Campylobacter* genome was also detected in poultry carcasses (23.1%), poultry blood (2.0%), raw cow milk (9.1%).

## CONCLUSION

The assay enabling detection of *Campylobacter* spp. genome in case of presence of approximately 40 target molecules was optimized based on the performed tests. The following rtPCR conditions were optimized: optimal magnesium concentration (2.5 mM) and primer annealing temperature (58 °C) were selected. Selected primers were found to be highly specific and give no false positive reac-

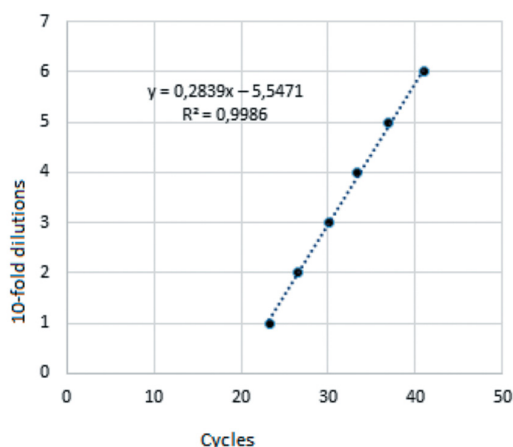


Fig. 2. Linear regression graphs of Ct when 10-fold dilutions of *Campylobacter* spp. DNA were tested with rtPCR

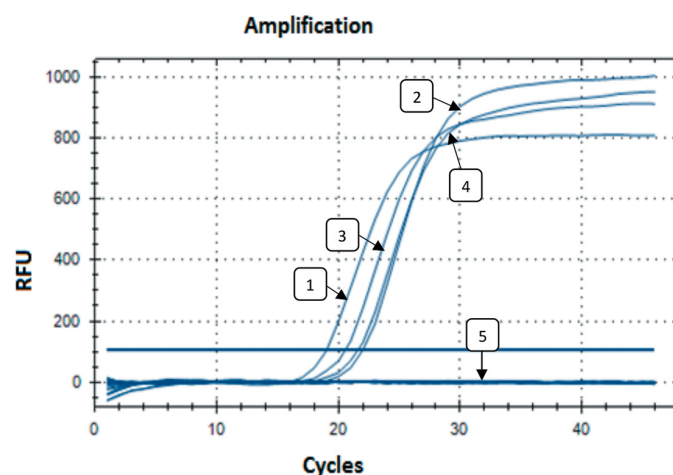


Fig. 3. Specificity of rtPCR for *Campylobacter* spp. genome identification

- 1 – positive control;
- 2 – *Campylobacter jejuni* ATCC 33291;
- 3 – *Campylobacter coli* ATCC 43478;
- 4 – *Campylobacter lari* ATCC 35221;
- 5 – non-target strains.

Table 3  
*Campylobacter* spp. genome detection in raw animal material samples with rtPCR assay

| Group No. | Sample name               | Number of samples |           |      |
|-----------|---------------------------|-------------------|-----------|------|
|           |                           | total             | positives | %    |
| 1         | Chicken meat preparations | 25                | 11        | 44.0 |
| 2         | Poultry                   | 13                | 3         | 23.1 |
| 3         | Raw cow milk              | 33                | 3         | 9.1  |
| 4         | Poultry blood             | 4                 | 1         | 25.0 |
| 5         | Litter swabs              | 1                 | 0         | 0    |
| Total     |                           | 76                | 18        | 23.7 |

tions. The assay was shown to enable accurate detection of *Campylobacter* spp. ( $R^2$  value  $> 0.99$ ) with PCR effectiveness of 92.26%.

The assay was approved for use under laboratory conditions upon testing 76 samples of raw animal materials (chicken products, raw cow milk, chicken biomaterials).

The test results suggest that the method is highly specific, sensitive and is able to detect *Campylobacter* spp. in tested samples.

Thus, proposed assay can be used as a rapid method in addition to classical methods applied for routine analysis at microbiological laboratories. Moreover, the said method can be used for assessment of *Campylobacter* spp. occurrence in food industry as well as in raw and processed products of animal origin.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- Minayev V. I., Cherkasskiy B. L., Minayeva N. Z. Modern laboratory diagnosis of campylobacteriosis [Laboratornaya diagnostika kampilobakterioza v sovremennykh usloviyakh]. *Žurnal mikrobiologii, épidemiologii i immunobiologii*. 1991; 8: 18–21 (in Russian).
- Nutrient medium for *Campylobacter* spp. isolation and cultivation [Pitateľnaya sreda dlya vydeleniya i kul'tivirovaniya kampilobakterij]. Z. U. Temirkhanova, P. Sh. Gashimova, N. V. Safonova [et al.]. *Microbiology*. 1999; 6: 27–30 (in Russian).
- Guidelines for performing PCR [Rekomendacii po postanovke PCR]. Evrogen. Ver. of 18 September, 2017. URL: <http://evrogen.ru/kit-user-manuals/Evrogen-PCR-recommendation.pdf> (in Russian).
- A one-year study of *Campylobacter* carriage by individual Danish broiler chickens as the basis for selection of *Campylobacter* spp. strains for a chicken infection model. D. D. Bang, E. M. Nielsen, K. Knudsen, M. Madsen. *Epidemiol. Infect.* 2003; 130 (2): 323–333; DOI: 10.1017/S095026880200821x.
- Bronowski C., James C. E., Winstanley C. Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2014; 356 (1): 8–19; DOI: 10.1111/1574-6968.12488.
- Campylobacter helveticus* sp. nov., a new thermophilic species from domestic animals: characterization, and cloning of a species-specific DNA probe. J. Stanley, A. P. Burnens, D. Linton [et al.]. *J. Gen. Microbiol.* 1992; 138 (11): 2293–2303; DOI: 10.1099/00221287-138-11-2293.
- Campylobacter hyointestinalis* subsp. *lawsonii* subsp. nov., isolated from the porcine stomach, and an emended description of *Campylobacter hyointestinalis*. S. L. On, B. Bloch, B. Holmes [et al.]. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995; 45 (4): 767–774; DOI: 10.1099/00207713-45-4-767.
- Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by real-time PCR. M. Lund, S. Nordentoft, K. Pedersen, M. Madsen. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42 (11): 5125–5132; DOI: 10.1128/JCM.42.11.5125-5132.2004.
- Diversity of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated in laboratory animals. N. S. Taylor, M. A. Ellenberger, P. I. Wu, J. G. Fox. *Lab. Anim. Sci.* 1989; 39 (30): 219–221; PMID: 2724920.
- Estimating the true incidence of campylobacteriosis and salmonellosis in the European Union, 2009. A. H. Havelaar, S. Ivarsson, M. Löfdahl, M. J. Nauta. *Epidemiol. Infect.* 2013; 141 (2): 293–302; DOI: 10.1017/S0950268812000568.
- Evaluation of a *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* real-time quantitative polymerase chain reaction for direct analysis of bovine preputial samples. B. Chaban, S. Chu, S. Hendrick [et al.]. *Can. J. Vet. Res.* 2012; 76 (3): 166–173; PMCID: PMC3384278.
- Fitzgerald C. *Campylobacter*. *Clin. Lab. Med.* 2015; 35 (2): 289–298; DOI: 10.1016/j.cll.2015.03.001.
- Foodborne illness acquired in the United States – Major pathogens. E. Scallan, R. M. Hoekstra, F. J. Angulo [et al.]. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17 (1): 7–15; DOI: 10.3201/eid1701.P11101.
- Global epidemiology of *Campylobacter* infection. N. O. Kaakoush, N. Castaño-Rodríguez, H. M. Mitchell, S. M. Man. *Clin. Microbiol. Rev.* 2015; 28 (3): 687–720; DOI: 10.1128/CMR.00006-15.
- Humphrey T., O'Brien S., Madsen M. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: A food production perspective. *Int. J. Food Microbiol.* 2007; 117 (3): 237–257; DOI: 10.1016/j.jfoodmicro.2007.01.006.
- Huq M., Gonis G., Istivan T. Development and evaluation of a multiplex PCR for the detection of *Campylobacter concisus* and other *Campylobacter* spp. from gastroenteritis cases. *Open J. Med. Microbiol.* 2014; 4 (1): 29–37; DOI: 10.4236/ojmm.2014.41005.
- Identification of *Campylobacter* isolated from Danish broilers by phenotypic tests and species-specific PCR assays. M. Wainø, D. D. Bang, M. Lund [et al.]. *J. Appl. Microbiol.* 2003; 95 (4): 649–655; DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.01996.x.
- Identification of hyperinvasive *Campylobacter jejuni* strains isolated from poultry and human clinical sources. C. Fearnley, G. Manning, M. Bagnall [et al.]. *J. Med. Microbiol.* 2008; 57 (5): 570–580; DOI: 10.1099/jmm.0.47803-0.
- Infectious agent and immune response characteristics of chronic enterocolitis in captive rhesus macaques. K. Sestak, C. K. Merritt, J. Borda [et al.]. *Infect. Immun.* 2003; 71 (7): 4079–4086; DOI: 10.1128/iai.71.7.4079-4086.2003.
- Lehtola M.J., Loades C. J., Keevil C. W. Advantages of peptide nucleic acid oligonucleotides for sensitive site directed 16S rRNA fluorescence in situ hybridization (FISH) detection of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari*. *J. Microbiol. Methods*. 2005; 62 (2): 211–219; DOI: 10.1016/j.mimet.2005.02.009.
- Man S. M. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2011; 8 (12): 669–685; DOI: 10.1038/nrgastro.2011.191.
- New methods for detection of campylobacters in stool samples in comparison to culture. E. Bessede, A. Delcamp, E. Sifré [et al.]. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49 (3): 941–944; DOI: 10.1128/JCM.01489-10.
- Pitkänen T. Review of *Campylobacter* spp. in drinking and environmental waters. *J. Microbiol. Methods*. 2013; 95 (1): 39–47; DOI: 10.1016/j.mimet.2013.06.008.
- Rodriguez-Lazaro D., Hernandez M., Pla M. Simultaneous quantitative detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* using a duplex real-time PCR-based assay. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004; 233 (2): 257–267; DOI: 10.1016/j.femsle.2004.02.018.
- The role of environmental reservoirs in human campylobacteriosis. H. Whitley, B. van den Akker, S. Giglio, R. Bentham. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2013; 10 (11): 5886–5907; DOI: 10.3390/ijerph10115886.
- Whitley H., McLean R., Ross K. Detection of *Campylobacter jejuni* in Lizard faeces from cenral Australia using quantitative PCR. *Pathogens*. 2017; 6 (1):1; DOI: 10.3390/pathogens6010001.
- Winters D. K., O'Leary A. E., Slavik M. F. Polymerase chain reaction for rapid detection of *Campylobacter jejuni* in artificially contaminated foods. *Lett. Appl. Microbiol.* 1998; 27 (3): 163–167; DOI: 10.1046/j.1472-765x.1998.00411.x.

Received on 27.05.19

Accepted for publication on 30.10.19

# БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИЗОЛЯТОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МОЛОКА И МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРОИЗВЕДЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ КРЫМ

**И. В. Бородкина**

Руководитель сектора, аспирант, филиал ФГБУ «ВНИИЗЖ» в Республике Крым, г. Симферополь, Россия, e-mail: borodkina@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-5324-7678

## РЕЗЮМЕ

Стафилококки являются одной из причин пищевых отравлений во многих странах мира. Интоксикация происходит из-за попадания в организм человека стафилококковых экзотоксинов. Один из основных источников стафилококковых токсинов — молоко и молочная продукция, загрязненная патогенными стафилококками. Наибольшее санитарно-гигиеническое значение имеет *Staphylococcus aureus*. В период с 2016 по 2018 г. в лаборатории безопасности пищевых продуктов филиала ФГБУ «ВНИИЗЖ» в Республике Крым проведены исследования 168 проб готовой молочной продукции на наличие бактерий *Staphylococcus aureus*. Испытания проводили в соответствии с ГОСТ 30347-2016 «Молоко и молочная продукция. Методы определения *Staphylococcus aureus*». Биохимические свойства выделенных изолятов изучали с применением анализатора Vitek 2 Compact. Установлено, что наиболее загрязнены золотистым стафилококком следующие группы продуктов: масло сливочное (20%), сметана (9,09%), творог и творожные продукты (4,55%), молоко питьевое пастеризованное в потребительской таре (4,35%). Изучены основные биологические свойства изолятов, определена их антибиотикорезистентность. Все выделенные культуры *Staphylococcus aureus* проявили 100%-ю чувствительность к бензилпенициллину, оксациллину, имипенему, тикарциллину, меропенему, ципрофлоксацину, офлоксацину, гентамицину, амикацину, доксициклину, тетрациклину, рифампицину, левомицетином, цефотаксиму, цефтриаксону, триметоприму и оказались на 100% резистентными к энрофлоксацину. У 28,6% изолятов определена резистентность по отношению к стрептомицину, а 14,3% изолятов устойчивы к ванкомицину. Среди выделенных бактерий метициллин-резистентных стафилококков не выявлено.

**Ключевые слова:** пищевые токсикозы, *Staphylococcus aureus*, молоко и молочная продукция, антибиотикорезистентность.

## ВВЕДЕНИЕ

Среди микроорганизмов, вызывающих пищевые токсикозы, значительная роль принадлежит токсигенным стафилококкам [13–16]. Стафилококки впервые выделены Луи Пастером в 1880 г. из гноя фурункула человека. Различают сапрофитные, условно-патогенные и патогенные виды. Сапрофитные виды содержатся в воздухе, почве, воде, на поверхности растений. Условно-патогенные и патогенные обитают в организме людей и животных: на коже и слизистых оболочках [1].

Чаще всего источником инфекции на пищевом производстве являются люди со стафилококковыми заболеваниями кожных покровов и дыхательных путей. Помимо больных, переносчиками могут быть и здоровые люди, у которых стафилококки выделяются с поверхности слизистых оболочек, кожных покровов, из фекалий [1, 6, 15].

Стафилококки, в том числе энтеротоксигенные, выделяют от многих сельскохозяйственных животных,

чаще при наличии у них каких-либо патологических процессов, например маститов. Стафилококки нередко обнаруживают в смывах с оборудования и инвентаря предприятий общественного питания и пищевой промышленности, особенно при их неудовлетворительном санитарном состоянии [6, 11, 15].

В связи с широким распространением стафилококков в природе велика вероятность загрязнения ими различных продуктов питания [6, 11, 15]. Наиболее частыми причинами стафилококковых токсикозов являются молоко и молочные продукты. Первостепенное санитарно-гигиеническое значение имеет *Staphylococcus aureus* (золотистый стафилококк) [1, 6, 7, 11, 15].

В техническом регламенте Таможенного союза 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции» допустимый уровень содержания *S. aureus* в продуктах переработки молока при выпуске их в об-

ращение колеблется в достаточно широких пределах. Так, в пастеризованном молоке, сливках, сметане, кисломолочных и сухих молочных продуктах бактерии *S. aureus* должны отсутствовать в объеме 1 см<sup>3</sup>; в твороге, творожных продуктах, масле сливочном – в 0,1 г; в твердых сырах и сырных продуктах – в 0,001 г [12].

В отличие от нормативных документов Российской Федерации, международные стандарты контролируют наличие не *S. aureus*, а коагулазоположительных стафилококков. Так, в Регламенте Комиссии (ЕС) № 1441/2007 от 05.12.2007 г. установлены критерии безопасности пищевых продуктов, готовых к употреблению, а также гигиенические показатели технологического процесса производства молока и молочных продуктов. Данный документ допускает наличие в молочных продуктах не более 10 клеток коагулазоположительных стафилококков в 1 г продукта [10].

В настоящее время выделение *S. aureus* в молоке и молочной продукции в Российской Федерации проводят согласно ГОСТ 30347-2016 «Молоко и молочная продукция. Методы определения *Staphylococcus aureus*», в котором в качестве селективных сред используют агар Байрд-Паркера, желточно-солевой или молочно-солевой агары. На желточно-солевом агаре колонии микроорганизмов имеют форму плоских дисков диаметром 2–4 мм белого, желтого, кремового, лимонного, золотистого цвета с ровными краями; вокруг колоний образуется радужное кольцо и зона помутнения среды. На агаре Байрд-Паркера наблюдают рост черных блестящих выпуклых колоний диаметром 1–1,5 мм, окруженных зоной просветления среды шириной 1–3 мм [3].

При выявлении характерного роста колоний на плотных питательных средах проводят дальнейшее подтверждение принадлежности выделенных микроорганизмов к коагулазоположительным стафилококкам, а именно к *S. aureus*. Для этого проводят окраску по Граму, определяют способность микроорганизмов образовывать каталазу, коагулировать плазму крови кролика, образовывать ацетонин и ферментировать мальтозу в аэробных условиях [2, 3].

Бактерии *S. aureus* – грамположительные кокки, образующие каталазу, способные коагулировать плазму крови, образовывать ацетонин и ферментировать мальтозу. Основными показателями вирулентности стафилококков являются гемолитическая активность, выработка фермента плазмокоагулазы и некротоксичность [1, 3, 6, 11].

Определение гемотоксина выполняется путем прямого посева культуры на кровяной мясо-пептонный агар (МПА), содержащий 5–10% дефибринированной кроличьей или бараньей крови. Определение плазмокоагулазы осуществляется путем внесения культуры стафилококка в пробирку с 5%-й цитратной плазмой крови кролика [3].

Определение некротоксина проводится путем внутрикожного введения кролику 0,2 см<sup>3</sup> взвеси суточной агаровой культуры стафилококка в физиологическом растворе с концентрацией 2 млрд клеток. Наблюдение за животным ведется в течение 24–48 ч [1, 5, 6, 11].

На сегодняшний день для медицины и науки в целом большой проблемой является быстрое формирование резистентности к применяемым антибактериальным препаратам среди различных микроорганизмов. Большинство ученых считает, что одной из причин развития антибиотикорезистентности у людей является попада-

ние в организм устойчивых штаммов микроорганизмов с продуктами животного происхождения, что, в свою очередь, может вызвать развитие резистентности у микроорганизмов, циркулирующих в организме человека. Как результат – снижение или потеря терапевтической эффективности антимикробных средств, применяемых в медицине [4].

Цель данной работы – выявление наличия бактерий *S. aureus* в молоке и молочной продукции, произведенной на территории Республики Крым, изучение биологических свойств выделенных изолятов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования по выделению бактерий *S. aureus* из молока и молочной продукции проводили на базе лаборатории безопасности пищевых продуктов лабораторно-диагностического центра филиала ФГБУ «ВНИИЗЖ» в Республике Крым.

**Объект испытаний.** В качестве объекта испытаний использовали образцы готовой молочной продукции, поступившие в 2016–2018 гг. в лабораторно-диагностический центр филиала ФГБУ «ВНИИЗЖ» как от территориального управления Россельхознадзора по Республике Крым и г. Севастополь в соответствии с планами мониторинговых исследований, так и от индивидуальных заказчиков.

**Контрольные штаммы:** *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC 6538.

**Питательные среды.** Для определения *S. aureus* в образцах молочной продукции в соответствии с ГОСТ 30347-2016 использовали солевой бульон и желточно-солевой агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск).

Для идентификации выделенных культур применяли набор красителей для окрашивания мазков по Граму, 3%-й раствор перекиси водорода, плазму кроликов (АО «НПО «Микроген», Москва), набор для приготовления среды Кларка (ООО «НИЦФ», Санкт-Петербург), среду Гисса (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), мальтозу.

**Определение *S. aureus* в молочных продуктах по ГОСТ 30347-2016.** Навеску продукта или его соответствующие разведения в объеме 1 см<sup>3</sup> засеивали в пробирки с необходимым объемом солевого бульона. Посевы помещали в термостат с температурой (37 ± 1) °C и инкубировали в течение (24 ± 1) ч. Далее проводили пересев на чашки Петри с желточно-солевым агаром. Посевы помещали в термостат с температурой (37 ± 1) °C и инкубировали в течение 24–48 ч. Результаты посевов оценивали визуально по характеру образовавшихся колоний на поверхности желточно-солевого агара. Плоские колонии в форме дисков, с ровными краями, белого, желтого, золотистого цвета, вокруг которых образовывались радужное кольцо и зона помутнения среды, свидетельствовали о принадлежности микроорганизмов к коагулазоположительным стафилококкам.

Для дальнейшей дифференциации изолированные колонии с характерным ростом пересевали на поверхность скошенного агара с целью получения суточных культур. После чего выполняли окрашивание по Граму, определяли способности микроорганизмов образовывать каталазу и коагулировать плазму крови кролика.

Принадлежность выявленных коагулазоположительных стафилококков к *S. aureus* определяли по способностям образования ацетонина и ферментации мальтозы.

Изоляты, образующие на желточно-солевом агаре плоские колонии в форме дисков, с ровными краями, белого, желтого, золотистого цвета, вокруг которых формируется радужное кольцо и зона помутнения среды; при микроскопии которых обнаруживаются грамположительные кокки; образующие каталазу; способные коагулировать плазму крови; образующие ацетонин и ферментирующие мальтозу в аэробных условиях, идентифицировали как *S. aureus*.

Наличие гемолитической активности регистрировали визуально по наличию зоны просветления вокруг колонии на 5%-м кровяном агаре. Результат оценивали через  $(48 \pm 1)$  ч.

Биохимические свойства выделенных культур определяли с использованием автоматического микробиологического анализатора Vitek 2 Compact (Biomérieux, Франция).

Определение антибиотикорезистентности. Чувствительность изолятов *S. aureus* к антимикробным препаратам определяли на триптон-соевом агаре (TSA) диско-диффузионным методом согласно МУК 4.2.1890-04. Оценку результатов проводили по наличию зон задержки роста микроорганизмов вокруг дисков. Диаметр зон задержки роста с учетом диаметра диска с антибиотиком измеряли при помощи линейки с точностью до 1 мм. Интерпретацию результатов осуществляли в соответствии с МУК 4.2.1890-04 [8].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В период с 2016 по 2018 г. в лаборатории безопасности пищевых продуктов лабораторно-диагностического центра филиала ФГБУ «ВНИИЗЖ» в Республике Крым были проведены исследования 168 проб готовой молочной продукции на наличие бактерий *S. aureus*, выделено 7 изолятов (табл. 1).

Было установлено, что контаминированы данными бактериями следующие группы продуктов: масло сливочное (20%), сметана (9,09%), творог и творожные продукты (4,55%), молоко питьевое пастеризованное в потребительской таре (4,35%) и продукты кисломолочные со сроком годности более 72 ч (2,63%). Полученные данные могут свидетельствовать о неудовлетворительном санитарном состоянии производства молочной продукции.

Таблица 1

Количество образцов готовой молочной продукции, контаминированной *S. aureus*

| Номер группы | Продукция                                              | Количество исследований | Выявление <i>S. aureus</i> |      |
|--------------|--------------------------------------------------------|-------------------------|----------------------------|------|
|              |                                                        |                         | Количество                 | %    |
| 1            | Молоко питьевое пастеризованное в потребительской таре | 46                      | 2                          | 4,35 |
| 2            | Сливки питьевые пастеризованные                        | 2                       | 0                          | 0    |
| 3            | Продукты кисломолочные со сроком годности более 72 ч   | 38                      | 1                          | 2,63 |
| 4            | Сметана                                                | 11                      | 1                          | 9,09 |
| 5            | Творог, творожные продукты                             | 44                      | 2                          | 4,55 |
| 6            | Сыр                                                    | 3                       | 0                          | 0    |
| 7            | Масло сливочное                                        | 5                       | 1                          | 20   |
| 8            | Спред                                                  | 1                       | 0                          | 0    |
| 9            | Мороженое                                              | 18                      | 0                          | 0    |
| Всего        |                                                        | 168                     | 7                          | 4,17 |

Следующим этапом работы было изучение биологических свойств полученных изолятов, а именно: окрашивание по Граму, каталазная и лецитиназная активность, реакция плазмокоагуляции, определение гемолитических свойств. Результаты представлены в таблице 2.

Как следует из таблицы 2, все выделенные изоляты – грамположительные кокки, способны образовывать каталазу, коагулировать плазму крови кролика, обладают лецитиназной активностью, вызывают  $\beta$ -гемолиз на 5%-м кровяном агаре (рис. 1), что подтверждает их принадлежность к *S. aureus*.

Дальнейшим этапом работы было изучение биохимических свойств полученных изолятов. Результаты исследований представлены в таблице 3.

Из таблицы 3 следует, что 100% полученных изолятов растут при высокой концентрации NaCl, фермен-

Таблица 2

Биологические свойства изолятов *S. aureus*

| Изолят <i>S. aureus</i> | Окраска по Граму | Реакция плазмокоагуляции | Гемолиз эритроцитов | Образование каталазы | Наличие лецитиназы |
|-------------------------|------------------|--------------------------|---------------------|----------------------|--------------------|
| 1                       | Г+               | +++                      | $\beta$ -гемолиз    | +                    | +                  |
| 2                       | Г+               | ++++                     | $\beta$ -гемолиз    | +                    | +                  |
| 3                       | Г+               | ++++                     | $\beta$ -гемолиз    | +                    | +                  |
| 4                       | Г+               | ++++                     | $\beta$ -гемолиз    | +                    | +                  |
| 5                       | Г+               | +++                      | $\beta$ -гемолиз    | +                    | +                  |
| 6                       | Г+               | ++++                     | $\beta$ -гемолиз    | +                    | +                  |
| 7                       | Г+               | ++++                     | $\beta$ -гемолиз    | +                    | +                  |

«++++» – положительная реакция, характеризующаяся появлением плотного сгустка в реакции с 5%-й плазмой крови кролика;

«+++» – положительная реакция, характеризующаяся появлением сгустка с небольшим отсеком в реакции с 5%-й плазмой крови кролика.



Рис. 1.  $\beta$ -гемолитическая активность изолята *S. aureus* № 242/18 Крым на 5%-м кровяном агаре

тируют D-галактозу, D-мальтозу, D-маннит, D-маннозу, сахарозу, D-трегалозу и не расщепляют D-рафинозу и D-ксилозу. Всем изучаемым изолятам свойственно наличие ферментов фосфатаза, лецитиназа и отсутствие фермента бета-глюкуронидаза. Фермент уреазы присутствует у 28,6% изолятов. В соответствии с данными определителя бактерий Берджи их можно отнести к *S. aureus* [9].

В отличие от данных определителя 42,9% изолятов ферментируют лактозу, а 28,6% – салицин. Фермент аргининдегидролаза 2, согласно определителю Берджи, должен присутствовать у всех изолятов, однако его наличие установлено лишь у 57,1% изучаемых культур. Данные несоответствия, по нашему мнению, можно отнести к биологическим особенностям выделенных микроорганизмов.

Таблица 3  
Биохимические свойства изолятов *S. aureus*

| № п/п | Наименование теста            | Изоляты <i>S. aureus</i> |   |   |   |   |   |   | Согласно определителю Берджи |
|-------|-------------------------------|--------------------------|---|---|---|---|---|---|------------------------------|
|       |                               | 1                        | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |                              |
| 1     | Аргининдегидролаза 2          | –                        | – | + | + | + | + | – | +                            |
| 2     | Фосфатаза                     | +                        | + | + | + | + | + | + | +                            |
| 3     | Бета-глюкуронидаза            | –                        | – | – | – | – | – | – | –                            |
| 4     | Лецитиназа                    | +                        | + | + | + | + | + | + | +                            |
| 5     | Уреаза                        | +                        | + | + | + | + | – | – | +/-                          |
| 6     | D-галактоза                   | +                        | + | + | + | + | + | + | +                            |
| 7     | Лактоза                       | +                        | – | – | – | – | + | + | +                            |
| 8     | D-мальтоза                    | +                        | + | + | + | + | + | + | +                            |
| 9     | Рост при 6,5% NaCl            | +                        | + | + | + | + | + | + | +                            |
| 10    | D-маннит                      | +                        | + | + | + | + | + | + | +                            |
| 11    | D-манноза                     | +                        | + | + | + | + | + | + | +                            |
| 12    | D-рафиноза                    | –                        | – | – | – | – | – | – | –                            |
| 13    | Салицин                       | +                        | – | – | – | – | + | – | –                            |
| 14    | Сахароза                      | +                        | + | + | + | + | + | + | +                            |
| 15    | D-трегалоза                   | +                        | + | + | + | + | + | + | +                            |
| 16    | D-ксилоза                     | –                        | – | – | – | – | – | – | –                            |
| 17    | Фосфатидилинозитфосфолипаза C | –                        | – | – | – | – | – | – | *                            |
| 18    | Аргининдегидролаза 1          | +                        | + | + | + | + | + | + | *                            |
| 19    | Бета-галактозидаза            | –                        | + | + | + | + | + | – | *                            |
| 20    | Альфа-глюкозидаза             | –                        | – | – | – | + | + | – | *                            |
| 21    | Ala-Phe-Pro-ариламидаза       | –                        | – | – | – | – | – | – | *                            |
| 22    | Циклодекстрин                 | –                        | – | – | – | – | – | – | *                            |
| 23    | L-аспартатариламидаза         | –                        | – | – | – | – | – | – | *                            |
| 24    | Бета-галактопиранозидаза      | –                        | – | – | – | – | – | – | *                            |
| 25    | Альфа-маннозидаза             | –                        | – | – | – | – | – | – | *                            |
| 26    | Лейцинариламидаза             | –                        | – | – | – | – | – | – | *                            |
| 27    | L-пролинариламидаза           | –                        | – | – | – | – | – | – | *                            |
| 28    | Альфа-галактозидаза           | –                        | – | – | – | – | – | – | *                            |
| 29    | L-пирролидонил-ариламидаза    | +                        | + | + | + | + | + | + | *                            |
| 30    | Аланинариламидаза             | –                        | – | – | – | + | – | – | *                            |
| 31    | Тирозинариламидаза            | –                        | – | – | – | – | – | – | *                            |
| 32    | D-сорбит                      | –                        | – | – | – | – | + | – | *                            |
| 33    | D-рибоза                      | +                        | + | + | + | + | + | – | *                            |
| 34    | L-лактат, подщелачивание      | +                        | + | + | + | + | + | + | *                            |
| 35    | N-ацетил-D-глюкозамин         | +                        | + | + | + | + | + | + | *                            |
| 36    | Метил-B-D-глюкопиранозид      | +                        | + | + | + | + | + | – | *                            |
| 37    | Пулулан                       | –                        | – | – | – | – | – | – | *                            |

«+» – положительная реакция; «–» – отрицательная реакция;

«+/-» – может присутствовать как положительная, так и отрицательная реакция; «\*» – нет данных.

Таблица 4

Антибиотикорезистентность изолятов *S. aureus*

| Антибиотик          | Диаметры зон подавления роста в соответствии с МУК 4.2.1890-04 [8], мм |       |     | Изоляты, количество (%) |          |          |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------|-------|-----|-------------------------|----------|----------|
|                     | P ≤                                                                    | П     | Ч ≥ | P ≤                     | П        | Ч ≥      |
| β-лактамы препараты |                                                                        |       |     |                         |          |          |
| Бензилпенициллин    | 8                                                                      | –     | 9   |                         |          | 7 (100)  |
| Оксациллин          | 10                                                                     | 11–12 | 13  |                         |          | 7 (100)  |
| Имипенем            | 13                                                                     | 14–17 | 18  |                         |          | 7 (100)  |
| Меропенем           | 12                                                                     | 13–19 | 20  |                         |          | 7 (100)  |
| Тикарциллин         | 11                                                                     | 12–16 | 17  |                         |          | 7 (100)  |
| Макролиды           |                                                                        |       |     |                         |          |          |
| Эритромицин         | 13                                                                     | 14–22 | 23  |                         | 2 (28,6) | 5 (71,4) |
| Фторхинолоны        |                                                                        |       |     |                         |          |          |
| Ципрофлоксацин      | 15                                                                     | 16–20 | 21  |                         |          | 7 (100)  |
| Офлоксацин          | 12                                                                     | 13–15 | 16  |                         |          | 7 (100)  |
| Энрофлоксацин       | 13                                                                     | 14–16 | 17  | 7 (100)                 |          |          |
| Аминогликозиды      |                                                                        |       |     |                         |          |          |
| Гентамицин          | 12                                                                     | 13–14 | 15  |                         |          | 7 (100)  |
| Амикацин            | 14                                                                     | 15–16 | 17  |                         |          | 7 (100)  |
| Канамицин           | 13                                                                     | 14–17 | 18  |                         | 2 (28,6) | 5 (71,4) |
| Стрептомицин        | 12                                                                     | 13–16 | 17  | 2 (28,6)                | 5 (71,4) |          |
| Гликопептиды        |                                                                        |       |     |                         |          |          |
| Ванкомицин          | 14                                                                     | –     | 15  | 1 (14,3)                |          | 6 (85,7) |
| Тетрациклины        |                                                                        |       |     |                         |          |          |
| Доксициклин         | 12                                                                     | 13–15 | 16  |                         |          | 7 (100)  |
| Тетрациклин         | 14                                                                     | 15–18 | 19  |                         |          | 7 (100)  |
| Рифампицин          |                                                                        |       |     |                         |          |          |
| Рифампицин          | 16                                                                     | 17–19 | 20  |                         |          | 7 (100)  |
| Цефалоспорины       |                                                                        |       |     |                         |          |          |
| Цефотаксим          | 14                                                                     | 15–18 | 19  |                         |          | 7 (100)  |
| Цефтриаксон         | 13                                                                     | 14–17 | 18  |                         |          | 7 (100)  |
| Цефтазидим          | 12                                                                     | 14–16 | 18  |                         | 4 (57,1) | 3 (42,9) |
| Другие              |                                                                        |       |     |                         |          |          |
| Левомецетин         | 12                                                                     | 13–17 | 18  |                         |          | 7 (100)  |
| Триметоприм         | 13                                                                     | 14–16 | 17  |                         |          | 7 (100)  |

Всем изучаемым изолятам свойственно наличие ферментов: аргининдегидролаза 1, L-пирролидонил-ариломидаза, L-лактат. У 71,4% микроорганизмов присутствует фермент бета-галактозидаза, у 28,6% – альфа-глюкозидаза, у 14,3% – аланинариламидаза.

85,7% изолятов расщепляют D-рибозу, метил-B-D-глюкопиранозид; 14,3% – D-сорбит. Все изучаемые бактерии (100%) расщепляют N-ацетил-D-глюкозамин и не разлагают циклодекстрин и пуллулан.

Ферменты фосфатидилинозитфосфолипаза C, Ala-Phe-Pro-ариламидаза, L-аспартатариламидаза, бета-галактопиранозидидаза, альфа-маннозидаза, лейцинариламидаза,

L-пролинариламидаза, альфа-галактозидаза, тирозин-ариламидаза у полученных изолятов не обнаружены.

Широкое распространение устойчивых форм патогенных микроорганизмов и снижение эффективности ряда антибиотиков в настоящее время является одной из основных проблем медицины и ветеринарии. *S. aureus* – одна из первых бактерий, у которой была обнаружена резистентность к ранее действующим антибиотикам. Устойчивость к метициллину, сопряженная с устойчивостью к классу β-лактамов антибиотиков, дала название метициллин-резистентным стафилококкам (MRSA) [4, 5].

Сейчас метициллин в клинической практике и в лабораторной диагностике не применяется, вместо него используют оксациллин, соответственно появился термин «оксациллинорезистентность», являющийся полным синонимом термина «метициллинорезистентность» [4, 5].

В соответствии с МУК 4.2.1890-04 определение чувствительности *Staphylococcus* spp. к  $\beta$ -лактамам антибактериальным препаратам должно включать выполнение двух тестов определения чувствительности: к бензилпенициллину и оксациллину [8].

Заключительным этапом работы было определение антибиотикорезистентности полученных изолятов. В соответствии с применяемой методикой микроорганизмы оценивали как чувствительные (Ч), резистентные (Р) и промежуточные (П). Полученные результаты представлены в таблице 4.

Для исследования были выбраны следующие группы антибиотиков: макролиды, фторхинолоны, аминокликозиды, гликопептиды, тетрациклины, рифампицин,  $\beta$ -лактамы препараты, цефалоспорины, левомицетин – всего двадцать два препарата.

Все выделенные культуры *S. aureus* проявили 100%-ю чувствительность к бензилпенициллину, оксациллину, имипенему, тикарциллину, меропенему, ципрофлоксацину, офлоксацину, гентамицину, амикацину, доксициклину, тетрациклину, рифампицину, левомицетину, цефотаксиму, цефтриаксону, триметоприму. Чувствительность к ванкомицину выявлена у 85,7% изолятов, к эритромицину и канамицину – у 71,4%, к цефтазидиму – у 42,9%.

Промежуточную резистентность к канамицину и эритромицину зафиксировали у 28,6% изучаемых культур, к цефтазидиму – у 57,1%, к стрептомицину – у 71,4% изолятов.

Все выделенные культуры *S. aureus* оказались на 100% резистентными к энрофлоксацину. У 28,6% изолятов выявлена резистентность по отношению к стрептомицину, 14,3% изолятов оказались резистентными к ванкомицину.

Среди полученных изолятов метициллин-резистентных (оксациллинорезистентных) стафилококков не выявлено.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В период с 2016 по 2018 г. в лаборатории безопасности пищевых продуктов филиала ФГБУ «ВНИИЗЖ» в Республике Крым проведены исследования 168 проб готовой молочной продукции на наличие бактерий *S. aureus*. Получено 7 изолятов *S. aureus*.

Установлено, что наиболее загрязнены следующими бактериями следующие группы продуктов: масло сливочное (20%), сметана (9,09%), творог и творожные продукты (4,55%), молоко питьевое пастеризованное в потребительской таре (4,35%).

Изучены основные культуральные и биохимические свойства полученных изолятов. Установлено, что по способности ферментировать лактозу (4 изолята), по способности расщеплять салицин (2 изолята), по при-

сутствию фермента аргининдегидролаза 2 (3 изолята) выделенные микроорганизмы отличаются от данных определителя бактерий Берджи.

Определена резистентность изучаемых культур по отношению к 22 антибиотикам. Большинство полученных изолятов были чувствительны ко всем использованным антибиотикам, при этом все изучаемые изоляты оказались устойчивы к энрофлоксацину.

Полученные изоляты не обладали метициллинорезистентностью (оксациллинорезистентностью) и являлись чувствительными к другим  $\beta$ -лактамам антибиотикам.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Акатов А. К., Зуева В. С. Стафилококки. – М.: Медицина, 1983. – 255 с.
- Гордина Е. М., Горовиц Э. С. Сравнительная характеристика биологических свойств *S. aureus*, выделенных от человека и птиц // Экология человека. – 2015. – № 5. – С. 52–56.
- ГОСТ 30347-2016. Молоко и молочная продукция. Методы определения *Staphylococcus aureus*. – М.: Стандартинформ, 2016. – 14 с.
- Демидовская Е. В. MRSA – знаменитый и неизвестный метициллин-резистентный *S. aureus*: механизмы резистентности, лабораторная диагностика, клиника и эпидемиология // Болезни и антибиотики. – 2012. – № 2 (7). – С. 40–47.
- Диагностика стафилококков и стрептококков / А. А. Шевченко, О. Ю. Черных, Л. В. Шевченко [и др.]. – Краснодар: КубГАУ, 2013. – 46 с.
- Клевакин В. М., Карцев В. Б. Санитарная микробиология пищевых продуктов. – Л.: Медицина, 1986. – 174 с.
- Молекулярно-генетическая идентификация штамма *Staphylococcus aureus* – возбудителя пищевой токсикоинфекции при вспышке в Санкт-Петербурге в 2013 г. / Г. Г. Онищенко, И. В. Аббаев, И. А. Дятлов [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2014. – № 9–10. – С. 33–38.
- МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.
- Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Т. 2: пер с англ. / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита [и др.]. – М.: Мир, 1997. – 368 с.
- Регламент (ЕС) № 1441/2007 от 5 декабря 2007 года, вносящий поправки в Регламент (ЕС) № 2073/2005 о микробиологических показателях для пищевых продуктов. – URL: [http://portal.fsvps.ru/sites/fsvps/documents/1485966675029\\_2007-1441.pdf](http://portal.fsvps.ru/sites/fsvps/documents/1485966675029_2007-1441.pdf) (дата обращения: 02.07.19).
- Сбойчаков В. Б. Санитарная микробиология: учебное пособие для студентов медицинских вузов. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 191 с.
- Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции»: утв. Решением комиссии Таможенного союза 09.12.2011 № 880. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/902320560>.
- Шепелин А. П., Дятлов И. А., Полосенко О. В. Микробиологический контроль качества пищевой продукции // Бактериология. – 2017. – Т. 2, № 2. – С. 39–47; DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-39-47.
- Шепелин А. П., Сергеева А. Б., Полосенко О. В. Выявление стафилококков при использовании современных импортозамещающих питательных сред // Бактериология. – 2018. – Т. 3, № 2. – С. 64–71; DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-64-71.
- Эпидемиологические особенности вспышки пищевой токсикоинфекции стафилококковой этиологии в Республике Саха (Якутия) / М. Е. Игнатова, Т. В. Корита, И. А. Дятлов [и др.] // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2016. – № 31. – С. 21–26.
- Inhibitory effects of two types of food additives on biofilm formation by foodborne pathogens / L. Liu, C. Ye, T. Soteyome [et al.] // Microbiology Open. – 2019. – Vol. 8 (9):e853; DOI: 10.1002/mbo3.853.

Поступила 26.08.19

Принята в печать 22.10.19

# BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATES RECOVERED FROM MILK AND DAIRY PRODUCTS MANUFACTURED IN THE REPUBLIC OF CRIMEA

I. V. Borodkina

Head of the Sector, PHD student, FGBI "ARRIAH" in the Republic of Crimea, Simferopol, Russia, e-mail: borodkina@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-5324-7678

## SUMMARY

Staphylococci are one of the causes of food poisoning in many countries of the world. Intoxication occurs due to staphylococcal exotoxins entering the human body. One of the main sources of staphylococcal toxins is milk and dairy products contaminated with pathogenic staphylococci. *Staphylococcus aureus* has the greatest sanitary and hygienic importance. In 2016–2018 168 samples of ready-to-eat dairy products were tested for *Staphylococcus aureus* in the Food Safety Laboratory of the FGBI "ARRIAH" in the Republic of Crimea. The tests were performed according to GOST 30347-2016 "Milk and dairy products. Methods of *Staphylococcus aureus* detection". Biochemical properties of the recovered isolates were studied using Vitek 2 Compact analyzer. It was established that the following groups of products are contaminated with *Staphylococcus aureus* to the greatest extent: butter (20%), sour cream (9.09%), curd and curd products (4.55%), pasteurized milk in the consumer packaging (4.35%). The basic biological characteristics of the isolates have been studied and their antimicrobial resistance has been determined. All the isolated *Staphylococcus aureus* cultures demonstrated a 100% sensitivity to benzylpenicillin, oxacillin, imipenem, ticarcillin, meropenem, ciprofloxacin, ofloxacin, gentamicin, amikacin, doxycycline, tetracycline, rifampin, chloramphenicol, cefotaxime, ceftriaxone, trimethoprim and were 100% resistant to enrofloxacin. Resistance to streptomycin was determined in 28.6% of isolates, and 14.3% of isolates were resistant to vancomycin. Methicillin-resistant staphylococci were not detected among the bacteria.

**Key words:** foodborne toxicosis, *Staphylococcus aureus*, milk and dairy products, antimicrobial resistance.

## INTRODUCTION

Among microorganisms causing foodborne toxicosis, a significant role belongs to toxigenic staphylococci [13–16]. Staphylococci were first isolated by Louis Pasteur in 1880 from the pus of a human abscess. There are saprophytic, opportunistic and pathogenic species. Saprophytic species are found in air, soil, water, on the surface of plants. Opportunistic and pathogenic species are observed in humans and animals: on the skin and mucous membranes [1].

Most often, the source of infection in the food industry is people with staphylococcal diseases of the skin and respiratory tract. Besides diseased people, healthy people in whom staphylococci are secreted from the surface of the mucous membranes, skin, and feces can also be carriers [1, 6, 15].

Staphylococci, including the enterotoxigenic ones, are isolated from many farm animals, more often if they demonstrate some pathological processes, for example, mastitis. Staphylococci are often detected in swabs from the equipment and tools of public catering and food industry

establishments, especially when they are in poor sanitary condition [6, 11, 15].

Due to the wide distribution of staphylococci in nature, there is a high probability of contamination of various food products by them [6, 11, 15]. The most common causes of staphylococcal toxicosis are milk and dairy products. *Staphylococcus aureus* is of primary hygiene significance [1, 6, 7, 11, 15].

In the Customs Union Technical R 033/2013 "On safety of milk and dairy products", the admissible level of *S. aureus* content in processed products, when marketed, varies widely. So, in pasteurized milk, cream, sour cream, sour-milk and dry milk products, bacteria *S. aureus* should be absent in a volume of 1 cm<sup>3</sup>; in cottage cheese, curd products, butter – in 0.1 g; in hard cheeses and cheese products – in 0.001 g [12].

Unlike the regulatory documents of the Russian Federation, international standards control the presence of

coagulase-positive staphylococci and not of *S. aureus*. Thus, Commission Regulation (EU) No. 1441/2007 of 05/05/2007 establishes the safety criteria for ready-to-eat foods, as well as hygienic indicators of the technological process for production of milk and dairy products. This document allows the presence of no more than 10 cells of coagulase-positive staphylococci per 1 g of product in dairy products [10].

Currently, *S. aureus* is isolated from milk and dairy products in the Russian Federation according to GOST 30347-2016 "Milk and dairy products. Methods for determination of *Staphylococcus aureus*", in which Baird-Parker agar, yolk-salt or milk-salt agar are used as selective media. On yolk-salt agar, colonies of microorganisms have the form of flat discs with a diameter of 2–4 mm and white, yellow, cream, lemon, golden color with smooth edges; around the colonies a rainbow ring and a hazy zone are formed. On Baird-Parker agar, growth of black shiny convex colonies, 1–1.5 mm diameter, surrounded by a clear zone of 1–3 mm wide, is observed [3].

When detecting the typical growth of colonies on solid nutrient media, further confirmation that isolated microorganisms belong to coagulase-positive staphylococci, namely *S. aureus*, is carried out. For this purpose Gram staining is performed, the ability of microorganisms to form catalase, coagulate rabbit blood plasma, form acetoin and ferment maltose under aerobic conditions is determined [2, 3].

*S. aureus* bacteria are gram-positive catalase-forming cocci, capable of coagulating blood plasma, forming acetoin and fermenting maltose. The main indicators of staphylococcal virulence are hemolytic activity, plasmocoagulase enzyme production and necrotoxicity [1, 3, 6, 11].

The determination of hemotoxin is carried out by direct culture inoculation on blood meat-peptone agar (MPA) containing 5–10% defibrinated rabbit or mutton blood. Determination of plasmocoagulase is carried out by adding a staphylococcus culture into a test tube with 5% rabbit citrate plasma [3].

Necrotoxin determination of is carried out by intradermal injection of 0.2 cm<sup>3</sup> suspension of daily agar staphylococcus culture in saline with a concentration of 2 billion cells to a rabbit. The animal is observed for 24–48 hours [1, 5, 6, 11].

Today, in medicine and science as a whole, the big problem is the rapid formation of resistance to antibiotics used against various microorganisms. Most scientists believe that one of the reasons for development of antimicrobial resistance in humans is ingestion of resistant microorganism strains with animal products, which, in turn, can cause development of resistance in microorganisms circulating in the human body. As a result, decrease or loss in the therapeutic efficacy of antimicrobial agents used in human medicine is observed [4].

The purpose of this work is to identify the presence of *S. aureus* bacteria in milk and dairy products produced in the Republic of Crimea and to study the biological properties of the recovered isolates.

## MATERIALS AND METHODS

Studies on isolation of *S. aureus* bacteria from milk and dairy products were carried out on the basis of the food safety laboratory of the Laboratory Diagnostic Center of the FGBI "ARRIAH" Branch in the Republic of Crimea.

**Test object.** Samples of ready-to-eat dairy products delivered to the Laboratory Diagnostic Center of the FGBI "ARRIAH" Branch in the Republic of Crimea both from the Rosselkhoznadzor Territorial Administration in the Republic of Crimea and the city of Sevastopol were used as the test object in accordance with the plans for monitoring studies, and from individual customers.

**Control strains:** *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC 6538.

**Nutrient media.** To determine *S. aureus* in samples of dairy products in accordance with GOST 30347-2016, salt broth and yolk-salt agar were used (FBUN SSC PMB, Obolensk).

To identify the recovered cultures, we used a set of dyes for staining Gram smears, a 3% solution of hydrogen peroxide, rabbit plasma (NPO Mikrogen JSC, Moscow), a set for preparation of Clark's medium (NITSF LLC, St. Petersburg), Wednesday Gissa (FBUN SSC PMB, Obolensk), maltose.

**Determination of *S. aureus* in dairy products according to GOST 30347-2016.** A sample of the product or its corresponding dilution in a volume of 1 cm<sup>3</sup> was inoculated in test tubes with the corresponding volume of salt broth. The inoculations were placed in a thermostat with a temperature of (37 ± 1) °C and incubated for (24 ± 1) h. Next, re-inoculation on Petri dishes with egg yolk-salt agar was performed. The inoculations were placed in a thermostat with a temperature of (37 ± 1) °C and incubated for 24–48 hours. The inoculation results were evaluated visually by the appearance of the colonies formed on the surface of yolk-salt agar. Flat disc-shaped colonies, with smooth edges, white, yellow, golden in color, around which a rainbow ring and a hazy zone formed, indicated that microorganisms belong to coagulase-positive staphylococci.

For further differentiation, isolated colonies with typical growth were subcultured onto the surface of slant agar in order to obtain one-day cultures. After that, Gram staining was performed, the ability of microorganisms to form catalase and the ability to coagulate rabbit blood plasma were determined.

Belonging of the identified coagulase-positive staphylococci to *S. aureus* was determined by the ability to form acetoin and the ability to ferment maltose.

Isolates forming flat disc-shaped colonies on egg yolk-salt agar with smooth edges, white, yellow, golden in color, around which a rainbow ring and a turbidity zone form; microscopy of which reveals gram-positive cocci; catalase forming; able to coagulate blood plasma; forming acetoin and fermenting maltose under aerobic conditions, were identified as *S. aureus*. Presence of hemolytic activity was assessed visually by the presence of the clear zone around the colony on 5% blood agar. The results were evaluated after (48 ± 1) h.

**Biochemical properties** of the recovered cultures were determined using a Vitek 2 Compact automatic microbiological analyzer (Biomerieux, France).

**Determination of antimicrobial resistance.** The sensitivity of *S. aureus* isolates to antimicrobial agents was determined on tryptone soy agar (TSA) by the disk diffusion method according to Methodical guidelines 4.2.1890-04. Evaluation of the results was carried out by the presence of inhibition zones around the disks. The diameter of inhibition zones, taking into account the diameter of the disk with the antibiotic, was measured using a ruler with an accuracy of 1 mm. The results were interpreted in accordance with MUK 4.2.1890-04 [8].

## RESULTS AND DISCUSSION

In the period from 2016 to 2018, 168 samples of ready-to-eat dairy products were tested for *S. aureus* in the Food Safety Laboratory of the Laboratory and Diagnosis Center of the All-Russian Scientific Research Institute of Health and Nutrition Branch in the Republic of Crimea, 7 isolates were recovered (Table 1).

It was found that the following product groups were contaminated with these bacteria: butter (20%), sour cream (9.09%), cottage cheese and curd products (4.55%), pasteurized milk in consumer containers (4.35%) and fermented dairy products with a shelf life of more than 72 hours (2.63%). The obtained data may indicate an unsatisfactory sanitary conditions for production of dairy products.

The next stage was the study of biological properties of the obtained isolates, namely: Gram staining, catalase and lecithinase activity, plasma coagulation reaction, determination of hemolytic properties. The results are presented in Table 2.

As follows from Table 2, all the recovered isolates, gram-positive cocci, are able to form catalase, have lecithinase activity, are able to coagulate rabbit blood plasma, and cause  $\beta$ -hemolysis on 5% blood agar (Fig. 1), which confirms their belonging to *S. aureus*.

The next stage was to study biochemical characteristics of the isolates. The results are demonstrated in Table 3.

From table 3 it follows that 100% of the recovered isolates grow at a high concentration of NaCl, ferment D-galactose, D-maltose, D-mannitol, D-mannose, sucrose, D-trehalose and do not cleave D-raffinose and D-xylose. All studied isolates are characterized by the presence of enzymes phosphatase, lecithinase and absence of the enzyme beta-glucuronidase. The urease enzyme is present in 28.6% of the isolates. In accordance with Burgey's Manual they can be attributed to *S. aureus* [9].

In contrast to the Manual data, 42.9% of the isolates ferment lactose, and 28.6% – salicin. The enzyme arginine dihydrolase 2, according to Bergey's Manual, should be present in all isolates, however, its presence is observed only in 57.1% of the tested cultures. In our opinion, these discrepancies can be attributed to the biological characteristics of the isolated microorganisms.

Presence of enzymes is characteristic of all the tested isolates: arginine dihydrolase 1, L-pyrrolidonyl-arylamidase, L-lactate. Beta-galactosidase enzyme is present in 71.4% of microorganisms, alpha-glucosidase in 28.6%, and alaninylamidase in 14.3%.

Table 1

Number of samples of ready-to-eat dairy products contaminated with *S. aureus*

| Group number | Products                                                   | Number of tests | <i>S. aureus</i> detection |      |
|--------------|------------------------------------------------------------|-----------------|----------------------------|------|
|              |                                                            |                 | Number                     | %    |
| 1            | Pasteurized drinking milk in consumer packaging            | 46              | 2                          | 4.35 |
| 2            | Pasteurized cream                                          | 2               | 0                          | 0    |
| 3            | Sour milk products with a shelf life of more than 72 hours | 38              | 1                          | 2.63 |
| 4            | Sour cream                                                 | 11              | 1                          | 9.09 |
| 5            | Curd, curd products                                        | 44              | 2                          | 4.55 |
| 6            | Cheese                                                     | 3               | 0                          | 0    |
| 7            | Butter                                                     | 5               | 1                          | 20   |
| 8            | Spread                                                     | 1               | 0                          | 0    |
| 9            | Ice cream                                                  | 18              | 0                          | 0    |
| Total        |                                                            | 168             | 7                          | 4.17 |



Fig. 1.  $\beta$ -hemolytic activity of the isolate *S. aureus* No. 242/18 Crimea on 5% blood agar

85.7% of the isolates cleave D-ribose, methyl-B-D-glucopyranoside; 14.3% – D-sorbitol. All the tested bacteria (100%) cleave N-acetyl-D-glucosamine and do not decompose cyclodextrin and pullulan.

Table 2

Biological characteristics of *S. aureus* isolates

| <i>S. aureus</i> isolate | Gram staining | Plasma coagulation reaction | RBC hemolysis      | Catalase formation | Presence of lecithinase |
|--------------------------|---------------|-----------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|
| 1                        | G+            | +++                         | $\beta$ -hemolysis | +                  | +                       |
| 2                        | G+            | ++++                        | $\beta$ -hemolysis | +                  | +                       |
| 3                        | G+            | ++++                        | $\beta$ -hemolysis | +                  | +                       |
| 4                        | G+            | ++++                        | $\beta$ -hemolysis | +                  | +                       |
| 5                        | G+            | +++                         | $\beta$ -hemolysis | +                  | +                       |
| 6                        | G+            | ++++                        | $\beta$ -hemolysis | +                  | +                       |
| 7                        | G+            | ++++                        | $\beta$ -hemolysis | +                  | +                       |

«++++» – positive reaction, characterized by appearance of a dense clot in the reaction with 5% rabbit blood plasma;

«+++» – positive reaction, characterized by the appearance of a clot with a small partition in the reaction with 5% rabbit blood plasma.

**Table 3**  
**Biochemical characteristics of *S. aureus* isolates**

| No. | Test                                 | <i>S. aureus</i> isolates |   |   |   |   |   |   | According to Bergey's manual |
|-----|--------------------------------------|---------------------------|---|---|---|---|---|---|------------------------------|
|     |                                      | 1                         | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |                              |
| 1   | Arginine dihydrolase 2               | –                         | – | + | + | + | + | – | +                            |
| 2   | Phosphatase                          | +                         | + | + | + | + | + | + | +                            |
| 3   | Beta glucuronidase                   | –                         | – | – | – | – | – | – | –                            |
| 4   | Lecithinase                          | +                         | + | + | + | + | + | + | +                            |
| 5   | Urease                               | +                         | + | + | + | + | – | – | +/-                          |
| 6   | D-galactose                          | +                         | + | + | + | + | + | + | +                            |
| 7   | Lactose                              | +                         | – | – | – | – | + | + | +                            |
| 8   | D-maltose                            | +                         | + | + | + | + | + | + | +                            |
| 9   | Growth at 6.5% NaCl                  | +                         | + | + | + | + | + | + | +                            |
| 10  | D-mannitol                           | +                         | + | + | + | + | + | + | +                            |
| 11  | D-mannose                            | +                         | + | + | + | + | + | + | +                            |
| 12  | D-melitose                           | –                         | – | – | – | – | – | – | –                            |
| 13  | Salicin                              | +                         | – | – | – | – | + | – | –                            |
| 14  | Sucrose                              | +                         | + | + | + | + | + | + | +                            |
| 15  | D-trehalose                          | +                         | + | + | + | + | + | + | +                            |
| 16  | D-xylose                             | –                         | – | – | – | – | – | – | –                            |
| 17  | Phosphatidylinositol phospholipase C | –                         | – | – | – | – | – | – | *                            |
| 18  | Arginine dihydrolase 1               | +                         | + | + | + | + | + | + | *                            |
| 19  | Beta galactosidase                   | –                         | + | + | + | + | + | – | *                            |
| 20  | Alpha glucosidase                    | –                         | – | – | – | + | + | – | *                            |
| 21  | Ala-Phe-Pro-arylamidase              | –                         | – | – | – | – | – | – | *                            |
| 22  | Cyclodextrin                         | –                         | – | – | – | – | – | – | *                            |
| 23  | L-aspartate amidase                  | –                         | – | – | – | – | – | – | *                            |
| 24  | Beta galactopyranosidase             | –                         | – | – | – | – | – | – | *                            |
| 25  | Alpha mannosidase                    | –                         | – | – | – | – | – | – | *                            |
| 26  | Leucinarilamidase                    | –                         | – | – | – | – | – | – | *                            |
| 27  | L-prolinarilamidase                  | –                         | – | – | – | – | – | – | *                            |
| 28  | Alpha galactosidase                  | –                         | – | – | – | – | – | – | *                            |
| 29  | L-pyrrolidonyl arylamidase           | +                         | + | + | + | + | + | + | *                            |
| 30  | Alaninarilamidase                    | –                         | – | – | – | + | – | – | *                            |
| 31  | Tyrosinarilamidase                   | –                         | – | – | – | – | – | – | *                            |
| 32  | D-sorbitol                           | –                         | – | – | – | – | + | – | *                            |
| 33  | D-ribose                             | +                         | + | + | + | + | + | – | *                            |
| 34  | L-lactate, alkalization              | +                         | + | + | + | + | + | + | *                            |
| 35  | N-Acetyl-D-Glucosamine               | +                         | + | + | + | + | + | + | *                            |
| 36  | Methyl-B-D-glucopyranoside           | +                         | + | + | + | + | + | – | *                            |
| 37  | Pullulan                             | –                         | – | – | – | – | – | – | *                            |

«+» – positive reaction;

«–» – negative reaction;

«+/-» – both positive and negative reactions may be present;

«\*» – no data available.

**Table 4**  
**Antimicrobial resistance of *S. aureus* isolates**

| Antibiotic                   | Inhibition zone diameter Methodical Guidance 4.2.1890-04 [8], mm |       |     | Number of isolates (%) |          |          |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------|-----|------------------------|----------|----------|
|                              | R ≤                                                              | I     | S ≥ | R ≤                    | I        | S ≥      |
| <b>β-lactam preparations</b> |                                                                  |       |     |                        |          |          |
| Benzylpenicillin             | 8                                                                | –     | 9   |                        |          | 7 (100)  |
| Oxacillin                    | 10                                                               | 11–12 | 13  |                        |          | 7 (100)  |
| Imipenem                     | 13                                                               | 14–17 | 18  |                        |          | 7 (100)  |
| Meropenem                    | 12                                                               | 13–19 | 20  |                        |          | 7 (100)  |
| Ticarcillin                  | 11                                                               | 12–16 | 17  |                        |          | 7 (100)  |
| <b>Macrolides</b>            |                                                                  |       |     |                        |          |          |
| Erythromycin                 | 13                                                               | 14–22 | 23  |                        | 2 (28.6) | 5 (71.4) |
| <b>Fluoroquinolones</b>      |                                                                  |       |     |                        |          |          |
| Ciprofloxacin                | 15                                                               | 16–20 | 21  |                        |          | 7 (100)  |
| Ofloxacin                    | 12                                                               | 13–15 | 16  |                        |          | 7 (100)  |
| Enrofloxacin                 | 13                                                               | 14–16 | 17  | 7 (100)                |          |          |
| <b>Aminoglycosides</b>       |                                                                  |       |     |                        |          |          |
| Gentamicin                   | 12                                                               | 13–14 | 15  |                        |          | 7 (100)  |
| Amikacin                     | 14                                                               | 15–16 | 17  |                        |          | 7 (100)  |
| Kanamycin                    | 13                                                               | 14–17 | 18  |                        | 2 (28.6) | 5 (71.4) |
| Streptomycin                 | 12                                                               | 13–16 | 17  | 2 (28.6)               | 5 (71.4) |          |
| <b>Glycopeptides</b>         |                                                                  |       |     |                        |          |          |
| Vancomycin                   | 14                                                               | –     | 15  | 1 (14.3)               |          | 6 (85.7) |
| <b>Tetracyclines</b>         |                                                                  |       |     |                        |          |          |
| Doxycycline                  | 12                                                               | 13–15 | 16  |                        |          | 7 (100)  |
| Tetracycline                 | 14                                                               | 15–18 | 19  |                        |          | 7 (100)  |
| <b>Rifampicin</b>            |                                                                  |       |     |                        |          |          |
| Rifampicin                   | 16                                                               | 17–19 | 20  |                        |          | 7 (100)  |
| <b>Cephalosporins</b>        |                                                                  |       |     |                        |          |          |
| Cefotaxime                   | 14                                                               | 15–18 | 19  |                        |          | 7 (100)  |
| Ceftriaxone                  | 13                                                               | 14–17 | 18  |                        |          | 7 (100)  |
| Ceftazidime                  | 12                                                               | 14–16 | 18  |                        | 4 (57.1) | 3 (42.9) |
| <b>Other</b>                 |                                                                  |       |     |                        |          |          |
| Chloramphenicol              | 12                                                               | 13–17 | 18  |                        |          | 7 (100)  |
| Trimethoprim                 | 13                                                               | 14–16 | 17  |                        |          | 7 (100)  |

Phosphatidylinositol phospholipase C, Ala-Phe-Pro-arylamidase, L-aspartate arylamidase, beta-galactopyranosidase, alpha-mannosidase, leucinyrylamidase, L-prolinerylamidase, alpha-galactosidase, tyrosinarylamidase enzymes are not found in the recovered isolates.

Wide spread of the resistant forms of pathogenic microorganisms and the decrease in the effectiveness of several antibiotics are currently one of the main problems of medicine and veterinary medicine. *S. aureus* is one of the first bacteria in which resistance to previously active antibiotics was found. Resistance to methicillin, coupled with resistance to the class of β-lactam antibiotics, gave the name methicillin-resistant staphylococci (MRSA) [4, 5].

Now methicillin is not used in clinical practice and in laboratory diagnostics, oxacillin is used instead, and the term “oxacillin resistance” has appeared, which is a complete synonym for the term “methicillin resistance” [4, 5].

In accordance with Methodical Guidelines 4.2.1890-04 determination of *Staphylococcus* spp. sensitivity to β-lactam antibacterial drugs should include performance of two sensitivity tests: to benzylpenicillin and oxacillin [8].

The final stage of the work was determination of antimicrobial resistance of the obtained isolates. In accordance with the methodology used, microorganisms were evaluated as sensitive (S), resistant (R) and intermediate (I). The results are presented in Table 4.

The following antibiotic groups were selected for the test: macrolides, fluoroquinolones, aminoglycosides, glycopeptides, tetracyclines, rifampicin,  $\beta$ -lactam drugs, cephalosporins, chloramphenicol – only twenty-two drugs.

All isolated cultures of *S. aureus* showed 100% sensitivity to benzylpenicillin, oxacillin, imipenem, ticarcillin, meropenem, ciprofloxacin, ofloxacin, gentamicin, amikacin, doxycycline, tetracycline, rifampicin, levomycetacitimetison, and cefot. Sensitivity to vancomycin was detected in 85.7% of isolates, to erythromycin and kanamycin – in 71.4%, to ceftazidime – in 42.9%. Intermediate resistance to kanamycin and erythromycin was observed in 28.6% of the tested cultures, to ceftazidime – in 57.1%, to streptomycin – in 71.4% of isolates.

All isolated cultures of *S. aureus* were 100% resistant to enrofloxacin. 28.6% of the isolates showed resistance to streptomycin, 14.3% of the isolates were resistant to vancomycin.

Methicillin-resistant (oxacillin-resistant) staphylococci were not detected in the recovered isolates.

## CONCLUSION

In the period from 2016 to 2018, 168 samples of ready-to-eat dairy products were tested for *S. aureus* bacteria in the Food Safety laboratory of the FGBI "ARRIAH" branch in the Republic of Crimea. Seven *S. aureus* isolates were detected.

The following product groups were found to be most contaminated with these bacteria: butter (20%), sour cream (9.09%), curd and curd products (4.55%), pasteurized milk in consumer packaging (4.35%).

The basic cultural and biochemical properties of the detected isolates were studied. It has been established that the isolated microorganisms differ in the ability to ferment lactose (4 isolates), the ability to cleave salicin (2 isolates), and the presence of the enzyme arginine dihydrolase 2 (3 isolates) from the data of the Bergey's Manual.

The resistance of the tested cultures to 22 antibiotics was determined. Most of the isolates were sensitive to all antibiotics used, while all the tested isolates were resistant to enrofloxacin.

The recovered isolates did not possess methicillin resistance (oxacillin resistance) and were sensitive to other  $\beta$ -lactam antibiotics.

**Conflict of interest.** The author declares no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Akatov A. K., Zueva V. S. Staphylococcus [Stafilokokki]. M.: Medicine, 1983 (in Russian).
2. Gordina E. M., Horowitz E. S. Comparative characteristics of biological properties of *S. aureus* isolated from humans and birds [Sravnitel'naya harakteristika biologicheskikh svoystv *S. aureus*, vydelennykh ot cheloveka i ptic]. *Human Ecology*. 2015; 5: 52–56 (in Russian).

3. GOST 30347-2016. Milk and dairy products. Methods for determination of *Staphylococcus aureus* [GOST 30347-2016. Moloko i molochnaya produkcija. Metody opredeleniya *Staphylococcus aureus*]. M.: Standartinform, 2016 (in Russian).

4. Demikhovskaya E. V. MRSA – the famous and unknown methicillin-resistant *S. aureus*: resistance mechanisms, laboratory diagnostics, clinical signs and epidemiology [MRSA – znamenitij i neizvestnyj metitsillin-rezistentnyj *S. aureus*: mekhanizmy rezistentnosti, laboratornaya diagnostika, klinika i epidemiologiya]. *Bolezni i antibiotiki*. 2012; 2 (7): 40–47 (in Russian).

5. Diagnosis of staphylococcosis and streptococcosis [Diagnostika stafilokokkozov i streptokokkozov]. A. A. Shevchenko, O. Yu. Chernykh, L. V. Shevchenko [et al.]. Krasnodar: KubSAU, 2013 (in Russian).

6. Klevakin V. M., Kartsev V. B. Sanitary microbiology of food products [Sanitarnaya mikrobiologiya pishchevykh produktov]. L.: Medicine, 1986 (in Russian).

7. Molecular and genetic identification of *Staphylococcus aureus* strain of foodborne toxicosis causative agent during an outbreak in St. Petersburg in 2013 [Molekulyarno-geneticheskaya identifikaciya shtamma *Staphylococcus aureus* – vzbuditelya pishchevoj toksikoinfekcii pri vspyshe v Sankt-Peterburge v 2013 g.]. G. G. Onishchenko, I. V. Abaev, I. A. Dyatlov [et al.]. *Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2014; 9–10: 33–38 (in Russian).

8. Methodical Guidelines 4.2.1890-04. Determination of sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs. Methodical instructions [MUK 4.2.1890-04. Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam. Metodicheskie ukazaniya]. M.: Federal Center for State Sanitary and Epidemiological Surveillance of the Russian Ministry of Health, 2004 (in Russian).

9. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. In 2 vols. Vol. 2. ed. J. Holet, N. Krieg, P. Snit [et al.]. 1997.

10. Regulation (EC) No. 1441/2007 of December 5, 2007 amending Regulation (EC) No. 2073/2005 on microbiological indicators for food products [Reglament (EC) № 1441/2007 ot 5 dekabrya 2007 goda, vnosyashchij popravki v Reglament (EC) № 2073/2005 o mikrobiologicheskikh pokazatelyah dlya pishchevykh produktov]. URL: [http://portal.fsvps.ru/sites/fsvps/documents/1485966675029\\_2007-1441.pdf](http://portal.fsvps.ru/sites/fsvps/documents/1485966675029_2007-1441.pdf) (date of access: 02.07.19) (in Russian).

11. Sboychakov V. B. Sanitary microbiology: a manual for students of medical universities [Sanitarnaya mikrobiologiya: uchebnoe posobie dlya studentov medicinskih vuzov]. M.: GEOTAR-Media, 2007 (in Russian).

12. Technical regulation of the Customs Union TR TS 021/2011 "On safety of food products" [Tekhnicheskij reglament Tamozhennogo soyuza TR TS 021/2011 «O bezopasnosti pishchevoj produkcii»]: approved by the decision of the Customs Union Commission, 09.12.2011 No. 880. URL: <http://docs.cntd.ru/document/902320560> (in Russian).

13. Shepelin A. P., Dyatlov I. A., Polosenko O. V. Microbiological quality control of food products [Mikrobiologicheskij kontrol' kachestva pishchevoj produkcii]. *Bacteriology*. 2017; 2 (2): 39–47; DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-39-47 (in Russian).

14. Shepelin A. P., Sergeeva A. B., Polosenko O. V. Identification of staphylococci using modern import-substituting culture media [Vyyavlenie stafilokokkov pri ispol'zovanii sovremennykh importozameshchayushchih pitatel'nykh sred]. *Bacteriology*. 2018; 3 (2): 64–71; DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-64-71 (in Russian).

15. Epidemiological features of an outbreak of foodborne toxicoinfection of staphylococcal etiology in the Republic of Sakha (Yakutia) [Epidemiologicheskie osobennosti vspyski pishchevoj toksikoinfekcii stafilokokkovoj etiologii v Respublike Saha (Yakutiya)]. M. E. Ignatieva, T. V. Korita, I. A. Dyatlov [et al.]. *Dal'nevostochnyj zhurnal infekcionnoj patologii*. 2016; 31: 21–26 (in Russian).

16. Inhibitory effects of two types of food additives on biofilm formation by foodborne pathogens. L. Liu, C. Ye, T. Soteyome [et al.]. *Microbiology Open*. 2019; 8 (9): e853; DOI: 10.1002/mbo3.853.

Submitted on 26.08.19  
Approved for publication on 22.10.19

# СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ИЗОЛЯТОВ БАКТЕРИЙ РОДА *SALMONELLA*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ СЫРЬЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

С. Е. Шмайхель<sup>1</sup>, Н. Б. Шадрова<sup>2</sup>, Е. С. Ерофеева<sup>3</sup>, С. И. Данильченко<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Ведущий ветеринарный врач, аспирант, филиал ФГБУ «ВНИИЗЖ» в Республике Крым, г. Симферополь, Россия, e-mail: shmaiheh@arriah.ru; ORCID ID 0000-0003-3740-1505

<sup>2</sup> Заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: shadrova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-7510-1269

<sup>3</sup> Заведующий лабораторией, филиал ФГБУ «ВНИИЗЖ» в Республике Крым, г. Симферополь, e-mail: erofeeva@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-5060-6105

<sup>4</sup> Руководитель лабораторно-диагностического центра, кандидат ветеринарных наук, e-mail: danylchenko@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-7796-7349

## РЕЗЮМЕ

Сальмонеллы продолжают быть основной причиной пищевых кишечных инфекций во многих странах мира. По официальным данным, 47% вспышек инфекций в мире относится к сальмонеллезам, при этом существенная роль фактора передачи инфекции человеку через пищевые продукты принадлежит куриному мясу (34%). С начала 90-х гг. прошлого века при массовом применении антибиотиков стали появляться штаммы *Salmonella*, устойчивые к целому ряду противомикробных препаратов, которые в настоящее время представляют серьезную проблему для общественного здравоохранения. Резистентные штаммы, персистирующие у животных, могут передаваться людям по пищевой цепочке через продукты питания. Представлены результаты изучения морфологических, биохимических, серологических свойств изолятов бактерий рода *Salmonella*, выделенных из сырья животного происхождения: говядины, свинины, мяса птицы, жира-сырца, субпродуктов цыплят-бройлеров, продуктов убоя свиней. В 2018 г. лабораторией микробиологических исследований ФГБУ «ВНИИЗЖ» всего проведено 1204 исследования сырья животного происхождения на наличие бактерий рода *Salmonella* и выделено 45 изолятов сальмонелл. Выделение бактерий рода *Salmonella* проводили в соответствии с ГОСТ 31659-2012 (ISO 6579:2002). Наибольшее количество изолятов сальмонелл (56%) было выделено из мяса птицы. Все изученные изоляты

сальмонелл по биохимическим свойствам были типичными: образовывали сероводород, сбрасывали глюкозу и маннит с образованием газа и кислоты, не утилизировали сахарозу, лактозу и мочевины; реакция на индол была отрицательна. Установлено, что выделенные изоляты сальмонелл относятся к серогруппам O<sub>7</sub>, O<sub>9</sub>, O<sub>3</sub>, O<sub>4</sub>. Частота выделения сальмонелл группы В составила 8,9%, группы С – 51,1%, группы Д – 40,0%. Среди сальмонелл группы В чаще встречались *S. derby* (4,4%) и *S. typhimurium* (2,2%); группы С – *S. infantis* (29,0%), *S. virchow* (17,8%); группы Д – *S. enteritidis* (40,0%). Отмечены единичные случаи выявления *S. reading* (2,2 %) и *S. oranienburg* (4,4 %). Все изоляты бактерий рода *Salmonella*, выделенные из сырья животного происхождения, проявили чувствительность к ципрофлоксацину, левомицетину, амоксициллину, амикацину, азитромицину, меропенему, гентамицину, цефтриаксону, канамицину; были менее чувствительны к цефотаксиму, ампициллину, левофлоксацину и слабо чувствительны к налидиксовой кислоте, доксициклину, стрептомицину, тетрациклину. Явление полирезистентности характерно для 44,4% выделенных изолятов сальмонелл.

**Ключевые слова:** сальмонеллы, зоонозы, серовар, изоляты, сырье животного происхождения, хромогенные питательные среды, антибиотикочувствительность.

UDC 637.071:579.842.14.004.12

# SEROLOGICAL CHARACTERISTICS AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *SALMONELLA* ISOLATES, RECOVERED FROM ANIMAL RAW MATERIAL

S. Ye. Shmaykhel<sup>1</sup>, N. B. Shadrova<sup>2</sup>, Ye. S. Yerofeyeva<sup>3</sup>, S. I. Danilchenko<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Leading Veterinarian, Post-Graduate Student, FGBI "ARRIAH" Branch in the Republic of Crimea, Simferopol, Russia, e-mail: shmaiheh@arriah.ru; ORCID ID 0000-0003-3740-1505

<sup>2</sup> Head of the Laboratory, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: shadrova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-7510-1269

<sup>3</sup> Head of the Laboratory, FGBI "ARRIAH" in the Republic of Crimea, Simferopol, Russia, e-mail: erofeeva@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-5060-6105

<sup>4</sup> Head of the Laboratory and Diagnosis Centre, Candidate of Science (Veterinary Medicine), e-mail: danylchenko@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-7796-7349

## SUMMARY

*Salmonella* continues to be the primary cause of foodborne intestinal infections in many countries around the world. According to the official data, 47% of the infection outbreaks in the world are associated with salmonellosis, while chicken meat (34%) plays a significant role in the infection transmission to humans through food. Since the early 90's of the last century, with the massive use of antibiotics, *Salmonella* strains resistant to a number of antimicrobials began to appear and currently pose a serious public health problem. Resistant strains persistent in animals can be transmitted to humans through the food chain. The paper presents results of studies of morphological, biochemical, serological properties of *Salmonella* bacteria recovered from animal raw material: beef, pork, poultry meat, tallow, offal derived from broiler chickens and pig slaughter products. In 2018 the FGBI "ARRIAH" Microbiological Laboratory performed 1,204 tests of animal raw material for *Salmonella* bacteria and recovered 45 *Salmonella* isolates. *Salmonella* bacteria were isolated in accordance with GOST 31659-2012 (ISO 6579:2002). Most *Salmonella* isolates (56%) were recovered from poultry meat. Biological properties of all the studied isolates were quite typical: they formed hydrogen sulfide, fermented glucose and mannitol

with the formation of gas and acid, did not utilize sucrose, lactose and urea; reaction to indole was negative. It was established that the recovered *Salmonella* isolates belong to serogroups O<sub>7</sub>, O<sub>9</sub>, O<sub>3</sub>, O<sub>4</sub>. The frequency of recovering *Salmonella* group B was 8.9%, group C – 51.1%, group D – 40.0%. Among *Salmonella* group B, *S. derby* (4.4%) and *S. typhimurium* (2.2%) were more common; group C – *S. infantis* (29.0%), *S. virchow* (17.8%); group D – *S. enteritidis* (40.0%). Isolated cases of *S. reading* (2.2%) and *S. oranienburg* (4.4%) were observed. All *Salmonella* isolates recovered from raw material of animal origin demonstrated sensitivity to ciprofloxacin, chloramphenicol, amoxicillin, amikacin, azithromycin, meropenem, gentamicin, ceftaxime, kanamycin; were less sensitive to cefotaxime, ampicillin, levofloxacin and had low sensitivity to nalidixic acid, doxycycline, streptomycin, tetracycline. The phenomenon of multiresistance is characteristic of 44.4% of the isolated *Salmonella* isolates.

**Key words:** *Salmonella*, zoonoses, serovar, isolates, raw materials of animal origin, chromogenic nutrient media, antimicrobial sensitivity.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время сальмонеллез широко распространен во многих странах мира, занимает большой удельный вес среди инфекционных болезней и представляет собой большую ветеринарную и медицинскую проблему в связи с опасностью заражения человека от больных животных и через пищевые продукты. Сальмонеллез (*Salmonellosis*) – это инфекционные заболевания, вызываемые многочисленными серотипами бактерий рода *Salmonella*, характеризуются разнообразными клиническими проявлениями от бессимптомного носительства и легких форм гастроэнтеритов до тяжелых генерализованных форм болезни, протекающих с резко выраженной интоксикацией и длительной лихорадкой [1, 2].

Филогенетический анализ позволяет отнести сальмонеллы к семейству энтеробактерий (*Enterobacteriaceae*) класса  $\gamma$ -*Proteobacteria*, роду сальмонелл (*Salmonella*), который состоит из микроорганизмов, родственных по фенотипическим и генотипическим свойствам. На основании анализа генома по современной классификации выделяют два вида – *S. bongori* и *S. enterica*. Вид *S. bongori* малочислен и состоит всего из 10 редко встречающихся сероваров (серотипов); *S. enterica* включает около 2500 сероваров. В пределах каждого серовара сальмонеллы подразделяются на биовары, фаговары. При этом ежегодно в референтных национальных центрах выделяют новые серотипы сальмонелл (40–60 в год) и исследуют их эпидемиологию [4, 18].

Различия генома сероваров сальмонелл составляют 3,8–4,6%, а аминокислотного состава экспрессирующих полипептидов – 0,7–1,3%. Поэтому серовары сальмонелл можно рассматривать как клоны, которые начали дивергировать от общего предшественника 25–40 млн лет тому назад [4, 13].

Сальмонеллы – факультативные внутриклеточные паразиты, которые могут внедряться в разные типы клеток, выживать во внутриклеточной среде, избегая природных механизмов уничтожения фагоцитированных микробов, и распространяться по организму внутри циркулирующих клеток. Будучи захваченными фагоцитами (нейтрофилами и макрофагами), сальмонеллы демонстрируют способность выживать и размножаться внутри этих клеток, находясь в особых вакуолях. У большинства сероваров сальмонелл плазмиды вирулентности не обнаружены, однако у наиболее важных с точки зрения здравоохранения сероваров (в том числе у *Typhimurium*, *Enteritidis* и *Choleraesuis*) плазмиды вирулентности имеются [13].

У сальмонелл есть факторы адгезии, колонизации и инвазии. Они имеют эндотоксин, а *S. typhimurium* и некоторые другие серотипы могут синтезировать два типа экзотоксинов: термолабильные и термостабильные энтеротоксины типа LT и ST, шигаподобные цитотоксины. Особенностью токсинов является внутриклеточная локализация и выделение после разрушения бактериальных клеток [6].

Адгезия возбудителя происходит при участии фимбрий и пилей, присутствующих на внешней мембране бактерий. В геноме сальмонелл закодирован набор белков кислотного шока, которые важны для выживания при низких значениях pH, чтобы сальмонеллы сохраняли жизнеспособность в кислой среде желудка, до того, как достигнут участков желудочно-кишечного тракта, пригодных для колонизации. Сальмонеллы

вызывают у человека три формы пищевой токсикоинфекции: гастроэнтерическую, холероподобную и гриппоподобную. Так, человек является единственным природным хозяином и резервуаром для сероваров *Typhi* и *Paratyphi A*. У людей указанные серовары вызывают системные инфекции – брюшной тиф и паратиф. Серовары *Gallinarum* и *Pullorum* выделяют от птиц; серовар *Dublin* вызывает тяжелую системную инфекцию у крупного рогатого скота и может вызвать болезнь у человека. Аналогичная ситуация с сероварами *Choleraesuis* и *Typhisuis*, выделяемыми от свиней, и с сероваром *Abortusovis* – возбудителем сальмонеллеза овец. Факторы, способствующие установлению носительства, изучены мало, однако наблюдается их зависимость от серовара. Из числа не леченных антибиотиками случаев брюшного тифа 10% заболевших выделяют *S. typhi* с фекалиями в течение 1–3 мес. и 2–5% пациентов становятся хроническими носителями сальмонелл. Нетифоидные серовары персистируют в желудочно-кишечном тракте теплокровных в среднем 1,5–3 мес., и лишь в 0,1% случаев устанавливается носительство. Характерной особенностью вспышек, эпидемиологически связанных с продукцией птицеводства, является принадлежность возбудителя к «птичьим» сероварам *Pullorum* и *Gallinarum* [8, 13].

Особую обеспокоенность вызывает тот факт, что у птиц сальмонеллез чаще протекает в скрытой форме. Но мясо и другие продукты, полученные от зараженной птицы, являются источником сальмонелл и могут представлять опасность для здоровья человека [5].

По данным Референс-центра по сальмонеллезам и глобального десятилетнего мониторинга ВОЗ за пищевыми инфекциями, 47% вспышек инфекций в мире относится к сальмонеллезам, при этом существенная роль фактора передачи инфекции человеку через пищевые продукты принадлежит куриному мясу (34%). В Российской Федерации к инкриминированным во вспышках сальмонеллеза человека пищевым продуктам относятся: мясо и мясopодукты – 63%, куриное мясо – 28%, яйцо – 5,5%. Из общего числа выделенных от животных штаммов сальмонелл в 49,6% случаев они обнаруживаются у птиц [12].

Сальмонеллы продолжают быть основной причиной пищевых кишечных инфекций во многих странах мира. Только в США 1,4 млн человек ежегодно заболевают сальмонеллезом, из них около 400 случаев – со смертельным исходом [10].

Анализ данных, опубликованных Всемирной организацией здравоохранения о выявлении возбудителей этой острой кишечной инфекции в 2009–2011 гг., показал, что в разных регионах земного шара (Европа, Северная и Южная Америка, Азия, Африка, Океания) наиболее часто причиной заболевания людей являются *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. virchow*, *S. panama*. Сведения за 2012–2013 гг. подтвердили такую тенденцию [7].

По данным Референс-центра по мониторингу за сальмонеллезами, в этиологической структуре сальмонеллезом у людей и животных продолжают доминировать *S. enteritidis* – 80,6% от числа сальмонелл, выделенных у людей, и 26,8% – у животных. В 2011 г., в отличие от 2010 г., в серовариантном пейзаже сальмонелл, выделенных из пищевых продуктов, ведущее положение занимала *S. typhimurium* (31,9%). Доля изолятов *S. infantis*, выделенных из продуктов питания, достаточно значима и составляет 14,6% [15].

В этиологической структуре сальмонеллезов животных в Российской Федерации ведущая роль принадлежит *S. enteritidis* (35,9%), *S. typhimurium* (13,7%), *S. dublin* (11,2%), *S. choleraesuis* (10,1%), *S. gallinarum* и *S. pullorum* (8,0%). Отмечена общность выявлений *S. enteritidis* у крупного рогатого скота, свиней, птицы и человека, *S. typhimurium* – у крупного рогатого скота и свиней, *S. choleraesuis* – у свиней и человека [8].

Мясо, молоко, яйца – главные пищевые продукты, через которые передается возбудитель сальмонеллеза. Особенностью зараженных сальмонеллами продуктов является отсутствие изменений, воспринимаемых органолептически: вид, цвет, запах, вкус – остаются без изменений [17].

В Российской Федерации отсутствие бактерий рода *Salmonella* в сырье животного происхождения регламентируется техническим регламентом Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011), контроль безопасности мяса птицы и продуктов, из него изготовленных, осуществляется в соответствии с СанПиНом 2.3.2.1078-01. Согласно этому нормативному документу в мясе (25 г из глубоких слоев), а также в мясе птицы механической обвалки и другой мясной продукции наличие сальмонелл не допускается [11, 14, 16].

С начала 90-х гг. XX в. при массовом применении антибиотиков стали появляться штаммы *Salmonella*, устойчивые к целому ряду противомикробных препаратов, которые в настоящее время представляют серьезную проблему для общественного здравоохранения. Резистентные штаммы, персистирующие у животных, могут передаваться людям по пищевой цепочке через продукты питания [3].

Цель работы: изучение биологических свойств изолятов бактерий рода *Salmonella*, выделенных из сырья животного происхождения в лаборатории микробиологических исследований ФГБУ «ВНИИЗЖ» за 2018 г.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемым сырьем животного происхождения являлись говядина, свинина, мясо птицы, жир-сырец, субпродукты цыплят-бройлеров, побочные продукты убоя свиней. Общее количество образцов составило 1204 пробы, из которых выделено 45 изолятов.

Выделение бактерий рода *Salmonella* осуществляли согласно ГОСТ 31659-2012 (ISO 6579:2002) «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*».

К навеске продукта массой 25 г добавляли 225 см<sup>3</sup> забуференне пептонной воды, гомогенизировали 1 мин и инкубировали при (37 ± 1) °C в течение (18 ± 1) ч. После этапа первичного обогащения по 1 см<sup>3</sup> суспензии вносили в 10 мл среды Раппапорта-Вассилиадиса (RVS) и селенитовой среды. Посевы инкубировали при температуре (41,5 ± 1) °C на протяжении (24 ± 1) ч. Далее проводили посев на поверхность двух сред: ксилозолизин-дезоксихолатного (XLD) и висмут-сульфитного (BCA) агаров.

Культуральные свойства изолятов изучали на питательном бульоне (ГРМ-бульон), питательном агаре (ГРМ-агар), среде Эндо, полужидком агаре. Посевы инкубировали при (37 ± 1) °C на протяжении (24 ± 1) ч.

Тинкториальные свойства изолятов бактерий рода *Salmonella* устанавливали путем микроскопии мазков суточных культур, окрашенных по Граму. Увеличение иммерсионного объектива составляло 100/1,25.

Для проведения биохимической и серологической идентификации, определения антибиотикорезистентности использовали чистые культуры бактерий рода *Salmonella*, полученные при инкубации типичных колоний на скошенном ГРМ-агаре.

Биохимическую идентификацию проводили согласно ГОСТ 31659-2012 (ISO 6579:2002) «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*» и ГОСТ 54354-2011 «Мясо и мясные продукты. Общие требования и методы микробиологического анализа» с применением полужидких сред Гисса с глюкозой, лактозой, маннитом, сахарозой, мальтозой, ксилозой. Дополнительно использовали хромогенные питательные среды: Рамбах-агар и агар для определения колиформ усиленной селективности.

Способность разлагать мочевины определяли путем посева штрихом на поверхность агара Кристенсена, для обнаружения индола в пробирки, содержащие питательный бульон с L-триптофаном, бактериологической петлей вносили исследуемые культуры. В пробирки с бульонной суточной культурой добавляли 1 см<sup>3</sup> реактива Ковача. Не позднее чем через 5 мин после этого учитывали реакцию среды по цвету образовавшегося кольца.

Серогрупповую и серовариантную принадлежность полученных изолятов определяли в реакции агглютинации на предметном стекле, используя сальмонеллезную поливалентную сыворотку ABCDE и монорецепторные O- и H-агглютинирующие сыворотки.

Антибиотикорезистентность изолятов бактерий рода *Salmonella* определяли диско-диффузионным методом с помощью бумажных дисков производства ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (Санкт-Петербург) согласно МУК 4.2.1890-04 [9].

Чувствительность определяли к следующим препаратам: азитромицин, меропенем, канамицин, налидиксовая кислота, стрептомицин, тетрациклин, амикацин, левофлоксацин, амоксициллин, ампициллин, гентамицин, доксициклин, цефтриаксон, цефотаксим, левомицетин, цiproфлоксацин.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении исследований в 2018 г. из 1204 образцов сырья животного происхождения всего выделено 45 изолятов сальмонелл. Наибольшее количество изолятов выделено из мяса птицы, говядины и свинины (рис. 1).

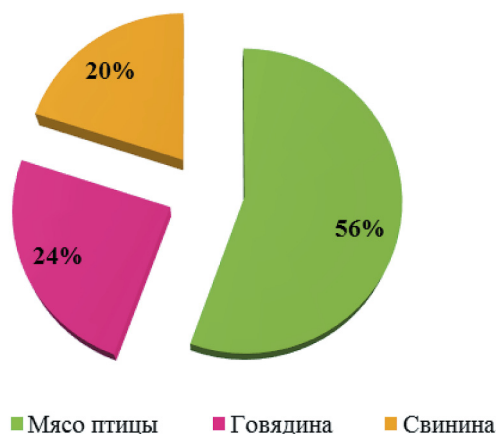


Рис. 1. Выявляемость бактерий рода *Salmonella* в различном сырье животного происхождения в 2018 г.

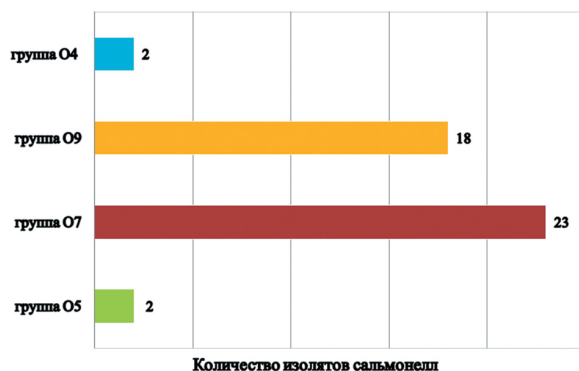


Рис. 2. Серогрупповая идентификация 45 изолятов бактерий рода *Salmonella*, выделенных из сырья животного происхождения

При исследовании морфологических свойств бактерий рода *Salmonella* было установлено, что это мелкие, прямые грамотрицательные палочки с закругленными краями. Все изоляты проявляли сходные культуральные и биохимические свойства: на питательном агаре образовывали гладкие выпуклые полупрозрачные округлые колонии диаметром 1–3 мм, в пробирках с питательным бульоном наблюдали равномерное помутнение среды и осадок серо-белого цвета.

На полужидком питательном агаре все культуры проявляли подвижность в виде диффузного роста по всему столбику агара, на XLD-агаре колонии имели черный центр и слегка прозрачную зону розоватого цвета вокруг колонии, на среде Эндо – круглые, прозрачные, слегка розоватые колонии, на висмут-сульфит агаре – черные округлые колонии с металлическим блеском и прокрашиванием среды под колониями. На Рамбах-агаре колонии сальмонелл были окрашены в красно-малиновый цвет.

Колонии всех полученных изолятов на хромогенном агаре при определении колиформ усиленной селективности были бесцветными, что означает отсутствие у бактерий рода *Salmonella* фермента  $\beta$ -галактозидазы.

Изоляты сальмонелл по биохимическим свойствам были типичными: образовывали сероводород, сбраживали глюкозу и маннит с образованием газа и кислоты, не утилизировали сахарозу, лактозу и мочевины; реакция на индол отрицательна.

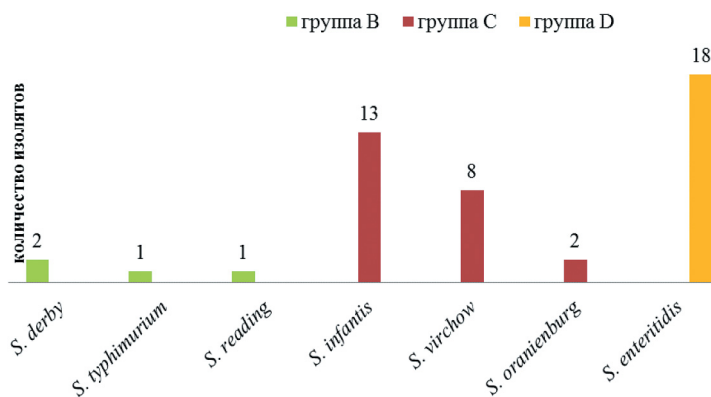


Рис. 3. Серовариантная принадлежность 45 изолятов бактерий рода *Salmonella*, выделенных из сырья животного происхождения

По результатам реакции агглютинации наибольшее количество изолятов относится к группе O<sub>7</sub>. Кроме того, в исследуемых образцах присутствовали сальмонеллы групп O<sub>9</sub>, O<sub>5</sub>, O<sub>4</sub> (рис. 2).

Частота выделения сальмонелл группы B составила 8,9%, группы C – 51,1%, группы D – 40,0%. Среди сальмонелл группы B чаще встречались *S. derby* (4,4%) и *S. typhimurium* (2,2%); группы C – *S. infantis* (29,0%), *S. virchow* (17,8%); группы D – *S. enteritidis* (40,0%). Отмечены единичные случаи выявления *S. reading* (2,2%) и *S. oranienburg* (4,4%) (рис. 3).

Для оценки антибиотикочувствительности изолятов измеряли диаметр зон задержки роста микроорганизмов вокруг дисков с антибиотиками. При измерении учитывали диаметр самого диска. По результатам измерений диаметра зон распределяли штаммы на чувствительные, промежуточные и устойчивые (табл.).

Выделенные изоляты проявили высокую чувствительность к меропенему (100%), азитромицину (97,8%), цефтриаксону (97,7%), амикацину (95,6%), гентамицину (95,6%), ципрофлоксацину, амоксициллину и левомецитину (по 93,3%). Наиболее резистентными сальмонеллы оказались к налидиксовой кислоте (82,0%), тетрациклину (55,6%), доксициклину (53,3%) (рис. 4).

В результате проведенных исследований было установлено, что для 44,4% выделенных изолятов сальмонелл характерно явление полирезистентности. Среди изолятов *S. infantis* 92,3% были устойчивы одновременно к двум группам антибиотиков: фторхинолонам (налидиксовая кислота) и тетрациклинам (тетрациклин). Все изученные изоляты *S. virchow* резистентны к цефалоспорином (цефотаксиму), пенициллинам (ампициллину) и аминогликозидам (стрептомицину). Высокая устойчивость отмечена у 76,9% изолятов *S. infantis* к аминогликозидам (стрептомицину) и у 87,5% изолятов *S. virchow* к фторхинолонам (налидиксовая кислота).

Среди изолятов *S. enteritidis* 88,9% устойчивы к фторхинолонам (налидиксовой кислоте) и 27,8% – к тетрациклинам (доксициклин, тетрациклин).

Среди прочих изолятов сальмонелл 66,6% устойчивы к тетрациклинам (доксициклин) и аминогликозидам (стрептомицину).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для оценки микробиологической безопасности сырья животного происхождения было проведено 1204 исследования на наличие бактерий рода *Salmonella*, в результате выделено 45 изолятов сальмонелл.

Морфологические, культуральные и биохимические свойства были идентичны для всех изолятов и типичны для бактерий рода *Salmonella*.

При определении серогрупповой принадлежности изолятов установлено, что наибольшее их количество относится к группе O<sub>7</sub>. Также в исследуемых образцах сырья животного происхождения были определены сальмонеллы групп O<sub>9</sub>, O<sub>5</sub>, O<sub>4</sub>. Преобладали серотипы: *S. enteritidis* (40,0%) и *S. infantis* (29,0%).

Все изоляты бактерий рода *Salmonella*, выделенные из сырья животного происхождения, проявили чувствительность к ципрофлоксацину, левомецитину, амоксициллину, амикацину, азитромицину, меропенему, гентамицину, цефтриаксону, канамицину, менее чувствительны были к цефотаксиму, ампициллину,

левофлоксацину и слабочувствительны к налидиксовой кислоте, доксициклину, стрептомицину, тетрациклину. Выделенные изоляты проявили высокую чувствительность к меропенему (100%), азитромицину (97,8%), цефтриаксону (97,7%), амикацину (95,6%), гентамицину (95,6%), ципрофлоксацину, амоксициллину и левомицетином (по 93,3%). Наиболее резистентными сальмонеллы оказались к налидиксовой кислоте (82,2%), доксициклину (53,3%), тетрациклину (55,6%). Явление полирезистентности характерно для 44,4% выделенных изолятов сальмонелл.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Богуцкий М. И. Сальмонеллезная инфекция // Журнал ГрГМУ. – 2011. – № 1 (33). – С. 7–11.
2. Заболеваемость сальмонеллезом сельскохозяйственных животных на территории Иркутской области / А. М. Аблов, Е. В. Анганова, А. С. Батомункуев, И. Г. Трофимов // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2-11. – С. 2381–2384.
3. Изучение антибиотикорезистентности сальмонелл, выделенных от животных и из пищевых продуктов животного происхождения на территории Российской Федерации / О. Н. Виткова, В. И. Белоусов, О. Е. Иванова, С. Б. Базарбаев // Ветеринария Кубани. – 2015. – № 2. – С. 11–15.
4. Инфекционная патология животных. Т. 3 / под ред. А. Я. Самуйленко. – М.: РАСХН, 2009. – 881 с.
5. Кныш Е. А., Матлахов А. А., Шмат Е. В. Ветеринарно-санитарные мероприятия при борьбе с сальмонеллезом на птицеводческих предприятиях // Научное сообщество студентов. Междисциплинарные исследования: эл. сб. ст. по материалам X междунар. студ. науч.-практ. конф. – Новосибирск: АНС «СибАК». – 2016. – № 7 (10). – URL: [https://sibac.info/archive/meghdiss/7\(10\).pdf](https://sibac.info/archive/meghdiss/7(10).pdf) (дата обращения: 06.10.19).

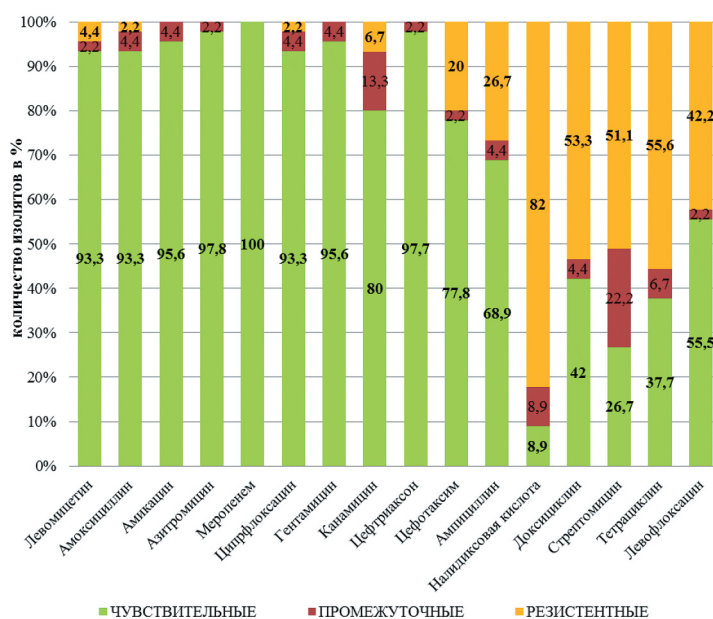


Рис. 4. Антибиотикочувствительность изолятов бактерий рода *Salmonella*, выделенных из сырья животного происхождения

6. Коротяев А. И., Бабичев С. А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: учебник для мед. вузов. – СПб.: СпецЛит, 2010. – 5-е изд., испр. и доп. – 760 с.
7. Костенко Ю. Г., Храмов М. В., Давлеев А. Д. Реальный взгляд на использование продуктов убоя животных при обнаружении сальмонелл // Все о мясе. – 2015. – №4 – С. 7–9.

## Таблица

Антибиотикорезистентность выделенных изолятов бактерий рода *Salmonella*

| Антибиотик           | Пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм) |       |    | Количество изолятов       |   |    |                         |   |   |                              |   |    |                                  |   |   |
|----------------------|----------------------------------------------------------|-------|----|---------------------------|---|----|-------------------------|---|---|------------------------------|---|----|----------------------------------|---|---|
|                      |                                                          |       |    | <i>S. infantis</i> n = 13 |   |    | <i>S. virchow</i> n = 8 |   |   | <i>S. enteritidis</i> n = 18 |   |    | Другие серотипы сальмонелл n = 6 |   |   |
|                      | Р                                                        | П     | Ч  | Р                         | П | Ч  | Р                       | П | Ч | Р                            | П | Ч  | Р                                | П | Ч |
| Левомецетин          | 12                                                       | 13–17 | 18 | 2                         | – | 11 | –                       | 1 | 7 | –                            | – | 18 | –                                | – | 6 |
| Амоксициллин         | 13                                                       | 14–16 | 17 | 1                         | 1 | 11 | –                       | – | 8 | –                            | 1 | 17 | –                                | – | 6 |
| Амикацин             | 14                                                       | 14–16 | 17 | –                         | – | 13 | –                       | 2 | 6 | –                            | – | 18 | –                                | – | 6 |
| Азитромицин          | 12                                                       | –     | 13 | –                         | – | 13 | –                       | – | 8 | –                            | 1 | 17 | –                                | – | 6 |
| Меропенем            | 13                                                       | 14–15 | 16 | –                         | – | 13 | –                       | – | 8 | –                            | – | 18 | –                                | – | 6 |
| Ципрофлоксацин       | 15                                                       | 16–20 | 21 | –                         | 1 | 12 | 1                       | 1 | 6 | –                            | – | 18 | –                                | – | 6 |
| Гентамицин           | 12                                                       | 13–14 | 15 | –                         | – | 13 | –                       | – | 8 | –                            | 1 | 17 | –                                | 1 | 5 |
| Канамицин            | 13                                                       | 14–17 | 18 | –                         | 1 | 12 | –                       | 2 | 6 | 2                            | 1 | 15 | 1                                | 2 | 3 |
| Цефтриаксон          | 13                                                       | 14–20 | 21 | –                         | – | 13 | –                       | 1 | 7 | –                            | – | 18 | –                                | – | 6 |
| Цефотаксим           | 14                                                       | 15–22 | 23 | –                         | – | 13 | 8                       | – | – | –                            | – | 18 | 1                                | 1 | 4 |
| Ампициллин           | 13                                                       | 14–16 | 17 | 1                         | – | 12 | 8                       | – | – | 1                            | 1 | 16 | 2                                | 1 | 3 |
| Налидиксовая кислота | 13                                                       | 14–18 | 19 | 12                        | 1 | –  | 7                       | – | 1 | 16                           | – | 2  | 2                                | 3 | 1 |
| Доксициклин          | 10                                                       | 11–16 | 14 | 11                        | – | 2  | 4                       | – | 4 | 5                            | 2 | 11 | 4                                | – | 2 |
| Стрептомицин         | 11                                                       | 12–14 | 15 | 10                        | 3 | –  | 8                       | – | – | 1                            | 6 | 11 | 4                                | 1 | 1 |
| Тетрациклин          | 11                                                       | 12–14 | 15 | 12                        | – | 1  | 6                       | 1 | 1 | 4                            | – | 14 | 3                                | 2 | 1 |
| Левифлоксацин        | 23                                                       | –     | 24 | 8                         | – | 5  | 6                       | 1 | 1 | 3                            | – | 15 | 2                                | – | 4 |

Р – резистентные; П – промежуточные; Ч – чувствительные изоляты.

8. Микробиологический контроль полуфабрикатов из мяса индеек при холодильном хранении / А. М. Абдуллаева, И. Р. Смирнова, Е. В. Трохимец [и др.] // Ветеринария. – 2017. – № 8. – С. 49–53.
9. МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. 4.3. Диффузионный метод (ДДМ). – Роспотребнадзор, 2004. – С. 18–24.
10. Предотвращение контаминации сальмонеллами продукции птицеводства – глобальная проблема / А. Н. Панин, А. В. Куликовский, А. Д. Давлеев, П. П. Сорокин // Птица и птицепродукты. – 2010. – № 5. – С. 62–65.
11. Проблема сальмонеллеза при производстве мясной продукции и пути ее решения / Ю. Г. Костенко, Д. С. Батаева, М. А. Краснова, М. В. Храмов // Все о мясе. – 2010. – № 5. – С. 50–51.
12. Проккоева Ж. А. Особенности бактериологических исследований цыплят, экспериментально инфицированных *Salmonella enteritidis*, на фоне применения пробиотического биокомплекса // БИО. – 2018. – № 11 (218). – С. 9–11.
13. Сальмонеллы: молекулярные механизмы приспособленности и факторы вирулентности / Д. Г. Ахметова, Ж. А. Бердыгулова, Е. Б. Евтихова, А. В. Шустов // Биотехнология. Теория и практика. – 2012. – № 1. – С. 3–24.
14. СанПиН 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов: утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 06.11.2001. – М., 2002. – 269 с.
15. Современные подходы к мониторингу за сальмонеллами / С. Ш. Рожнова, О. А. Христюхина, Н. К. Акулова [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2013. – № 2 (69). – С. 12–18.
16. ТР ТС 021/2011. О безопасности пищевой продукции: утв. Решением комиссии Таможенного союза 09.12.2011 № 880. – 218 с.
17. Хурай Р. Я., Марченко Т. В., Глотова Е. В. Сальмонеллез // Ветеринария Кубани. – 2012. – № 3. – С. 23–24.
18. Чугунова Е. О., Татарникова Н. А. Сальмонеллез сельскохозяйственных животных и птиц: характеристика возбудителя, распространенность в Пермском крае и эпидемиологическое значение: учебное пособие. – Пермь: Прокрост, 2014. – 134 с.
6. Korotyaev A. I., Babichev S. A. Medical microbiology, immunology and virology [Medicinskaya mikrobiologiya, immunologiya i virusologiya]: a textbook for medical universities. SPb.: SpetsLit, 2010. 5<sup>th</sup> ed., rev. and add. (in Russian).
7. Kostenko Yu. G., Hramov M. V., Davleev A. D. A real look at the use of animal slaughter products in detection of *Salmonella* [Real'nyy vzglyad na ispol'zovanie produktov uboya zhivotnykh pri obnaruzhenii sal'monell]. Vse o myase. 2015; 4: 7–9 (in Russian).
8. Microbiological control of semi-finished products from turkey meat during refrigerated storage [Mikrobiologicheskij kontrol' polufabrikatov iz myasa indeek pri holodil'nom hranenii]. A. M. Abdullaeva, I. R. Smirnova, E. V. Trohimets [et al.]. Veterinariya. 2017; 8:49–53 (in Russian).
9. Methodical Guidelines 4.2.1890-04. Determination of the micro-organism sensitivity to antimicrobials. 4.3. Disc diffusion method (DDM) [MUK 4.2.1890-04. Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam. 4.3. Disko-diffuzionnyy metod (DDM)]. Rospotrebnadzor, 2004: 18–24 (in Russian).
10. Prevention of *salmonella* contamination by poultry products – a global problem [Predotvrashchenie kontaminatsii sal'monellami produktsii pticevodstva – global'naya problema]. A. N. Panin, A. V. Kulikovskiy, A. D. Davleev, P. P. Sorokin. Poultry and Poultry Products. 2010; 5: 62–65 (in Russian).
11. The problem of salmonellosis in the production of meat products and ways to solve it [Problema sal'monelleza pri proizvodstve myasnoj produktsii i puti ee resheniya]. Yu. G. Kostenko, D. S. Bataev, M. A. Krasnov, M. V. Khramov. Vse o myase. 2010; 5: 50–51 (in Russian).
12. Prokkoeva J. A. Features of bacteriological studies of chickens experimentally infected with *Salmonella enteritidis*, when using a probiotic biocomplex [Osobennosti bakteriologicheskikh issledovaniy cyplyat, eksperimental'no infitsirovannykh *Salmonella enteritidis*, na fone primeneniya probioticheskogo biokompleksa]. BIO. 2018; 11 (218): 9–11 (in Russian).
13. Salmonella: molecular mechanisms of fitness and virulence factors [Sal'monelly: molekulyarnye mekhanizmy prispособlennosti i faktory virulentnosti]. D. G. Akhmetova, J. A. Berdygulova, E. B. Evtikhova, A. V. Shustov. Biotekhnologiya. Teoriya i praktika. 2012; 1: 3–24 (in Russian).
14. SanPiN 2.3.2.1078-01. Hygienic requirements for safety and nutritional value of food products [SanPiN 2.3.2.1078-01. Gigenicheskie trebovaniya bezopasnosti i pishchevoj cennosti pishchevykh produktov]: approved by the chief medical officer of the Russian Federation 06.11.2001. M., 2002 (in Russian).
15. Modern approaches to salmonellosis monitoring [Sovremennyye podhody k monitoringu za sal'monellezami]. S. Sh. Rozhnova, O. A. Khristyukhina, N. K. Akulova [et al.]. Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika. 2013; 2 (69): 12–18 (in Russian).
16. CU TR 021/2011. On food safety [TR TS 021/2011. O bezopasnosti pishchevoj produktsii]: approved by the decision of the CU Commission, 09.12.2011 No. 880 (in Russian).
17. Khurai R. I., Marchenko T. V., Glotova E. V. Salmonellosis [Sal'monellez]. Veterinariya Kubani. 2012; 3: 23–24 (in Russian).
18. Chugunova E. O., Tatarnikova N. A. Salmonellosis in farm animals and birds: characteristics of the pathogen, prevalence in the Perm Oblast and epidemiological significance [Sal'monellez sel'skhozaystvennykh zhivotnykh i ptic: harakteristika vzbuditelya, rasprostranennost' v Permskom krae i epidemiologicheskoe znachenie]: Training Manual. Perm: Prokrost, 2014 (in Russian).

## REFERENCES

1. Bogutsky M. I. Salmonella infection [Sal'monelleznaya infektsiya]. Journal of State Medical University. 2011; 1 (33): 7–11 (in Russian).
2. *Salmonella* incidence of in farm animals in the Irkutsk region [Zabolevaemost' sal'monellezom sel'skhozaystvennykh zhivotnykh na territorii Irkutskoj oblasti]. A. M. Ablov, E. V. Anganova, A. S. Batomunkuev, I. G. Trofimov. Fundamental Research. 2015; 2–11: 2381–2384 (in Russian).
3. The study of antibiotic resistance of *Salmonella* isolated from animals and from food products of animal origin in the territory of the Russian Federation [Izuchenie antibiotikorezistentnosti sal'monell, vydelennykh ot zhivotnykh i iz pishchevykh produktov zhivotnogo proiskhozhdeniya na territorii Rossijskoj Federatsii]. O. N. Vitkova, V. I. Belousov, O. E. Ivanova, S. B. Bazarbaev. Veterinariya Kubani. 2015; 2: 11–15 (in Russian).
4. Infectious pathology of animals [Infektsionnaya patologiya zhivotnykh]. Vol. 3. ed. A. Ya. Samuilenko. M.: RAAS, 2009 (in Russian).
5. Knysh E. A., Matlakhov A. A., Shmat E. V. Veterinary and sanitary measures in salmonellosis control in poultry establishments [Veterinarno-sanitarnyye meropriyatiya pri bor'be s sal'monellezom na pticevodcheskikh predpriyatiyah]. Scientific community of students. Interdisciplinary research: Electronic collection of papers based on materials of X International Scientific-practical conf. Novosibirsk: ANS "SibAK". 2016; 7 (10). URL: [https://sibac.info/archive/meghdis/7\(10\).pdf](https://sibac.info/archive/meghdis/7(10).pdf) (accessed October 6, 19). (in Russian).

Поступила 19.10.19

Принята в печать 27.11.19

# КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ВИРУСА РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ШТАММА «АБ 1908»

В. В. Кирпиченко<sup>1</sup>, С. В. Кононова<sup>2</sup>, А. В. Кононов<sup>3</sup>, О. П. Бьядовская<sup>4</sup>, Б. Л. Манин<sup>5</sup>, А. В. Спрыгин<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: kirpichenko@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-2494-3826

<sup>2</sup> Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: kononova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-3932-2416

<sup>3</sup> Начальник отдела, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: kononov@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-5523-3261

<sup>4</sup> Заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-8326-7151

<sup>5</sup> Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: manin@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-5263-1491

<sup>6</sup> Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: sprygin@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-5982-3675

## РЕЗЮМЕ

Респираторные заболевания крупного рогатого скота являются одними из наиболее распространенных патологий, а также важным фактором, обуславливающим экономический ущерб, связанный с финансовыми потерями и затратами на лечение и диагностику заболеваний. Одну из ведущих позиций в развитии респираторной патологии занимает респираторно-синцитиальная инфекция крупного рогатого скота. Анализ результатов серологических исследований, проведенных в референтной лаборатории болезней КРС ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2017–2018 гг., показал, что серопревалентность животных к респираторно-синцитиальной инфекции в молочных хозяйствах составила 60%. При этом было отмечено, что наиболее восприимчивыми животными к данной инфекции являются телята в возрасте до одного года. Эффективность мер борьбы с респираторно-синцитиальной инфекцией крупного рогатого скота зависит от своевременной постановки диагноза, для этого необходимы надежные и точные средства диагностики, в том числе оптимальные методы выделения вируса из патологического материала. Для успешного выделения вируса из клинических образцов необходимо точно соблюдать оптимальные параметры культивирования данного возбудителя. В статье представлены данные по изучению

культуральных свойств вируса респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота штамма «АБ 1908». В результате проведенных исследований было установлено, что перевиваемая культура клеток слизистой носовых перегородок крупного рогатого скота (BT), перевиваемая линия клеток трахеи эмбриона коровы (FBT) и перевиваемая линия клеток почки телят (RBT) являются чувствительными системами для культивирования данного возбудителя и могут быть использованы для получения вирусной суспензии с целью дальнейших научных исследований. Титр вируса в культуре клеток BT был на уровне  $4,33 \pm 0,16 - 4,66 \pm 0,12$  лг ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, в культуре клеток RBT –  $4,33 \pm 0,33 - 4,7 \pm 0,36$  лг ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> и в культуре клеток FBT –  $4,13 \pm 0,20 - 4,78 \pm 0,17$  лг ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Также в ходе проделанной работы были определены оптимальные параметры культивирования возбудителя в данных чувствительных культурах клеток: возраст культуры для инфицирования вирусом – 1–2 сут, множественность заражения – 0,1 ТЦД<sub>50</sub>/кл.

**Ключевые слова:** респираторно-синцитиальный вирус крупного рогатого скота, штамм «АБ 1908», культура клеток, культивирование, титр вируса, инфекционная активность.

UDC 619:578.231.31:636.22/.28:57.082.26

# CULTURAL PROPERTIES OF BOVINE RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS STRAIN AB1908

V. V. Kirpichenko<sup>1</sup>, S. V. Kononova<sup>2</sup>, A. V. Kononov<sup>3</sup>, O. P. Byadovskaya<sup>4</sup>, B. L. Manin<sup>5</sup>, A. V. Sprygin<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Post-Graduate Student, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: kirpichenko@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-2494-3826

<sup>2</sup> Leading Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: kononova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-3932-2416

<sup>3</sup> Head of Department, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: kononov@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-5523-3261

<sup>4</sup> Head of Laboratory, Candidate of Sciences (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-8326-7151

<sup>5</sup> Leading Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: manin@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-5263-1491

<sup>6</sup> Senior Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: sprygin@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-5982-3675

## SUMMARY

Cattle respiratory diseases are some of the most spread pathologies that can cause economic damage, resulting from financial losses and costs of treatment and diagnostics. One of the major factors contributing to respiratory pathology development is bovine respiratory syncytial infection. The analysis of serological testing, performed by the FGBI "ARRIAH" Reference Laboratory for Cattle Diseases in 2017–2018, showed that respiratory syncytial virus seroprevalence in animals of dairy farms is 60%. Herewith, it was noted that the most susceptible animals to this infection are calves under one year of age. The effectiveness of bovine respiratory syncytial infection control measures depends on timely diagnosis; that is why reliable and accurate diagnostic tools are needed, including optimal techniques of virus isolation from pathological material. For successful virus isolation from clinical samples, it is necessary to adhere strictly to optimal parameters of this agent cultivation. This paper pre-

sents data on study of bovine respiratory syncytial virus strain AB 1908 cultural properties. The tests performed showed that a continuous bovine turbinate (BT) cell line, continuous bovine fetal trachea (FBT) cell line and continuous bovine calf kidney (RBT) cell line are sensitive for cultivation of this agent and can be used to prepare viral suspension, needed for further research. Virus titre in BT cell culture was  $4.33 \pm 0.16 - 4.66 \pm 0.12$  lg TCID<sub>50</sub>/cm<sup>3</sup>, in RBT cell culture –  $4.33 \pm 0.33 - 4.7 \pm 0.36$  lg TCID<sub>50</sub>/cm<sup>3</sup> and in FBT cell culture –  $4.13 \pm 0.20 - 4.78 \pm 0.17$  lg TCID<sub>50</sub>/cm<sup>3</sup>. The following virus cultivation optimal parameters were also determined during this study: the age of the culture for virus inoculation should be 1–2 days and multiplicity of inoculation should be 0.1 TCID<sub>50</sub>/cell.

**Key words:** bovine respiratory syncytial virus, AB 1908 strain, cell culture, cultivation, virus titre, infectivity.

## ВВЕДЕНИЕ

Значимую часть экономического ущерба, связанного со снижением скорости развития и роста больных животных, затратами на лечение, а также диагностическими и профилактическими мероприятиями, составляют респираторные заболевания крупного рогатого скота (КРС) [4]. Одну из ведущих позиций в развитии респираторной патологии занимает респираторно-синцитиальная вирусная инфекция крупного рогатого скота.

Респираторно-синцитиальная инфекция крупного рогатого скота (РСИ КРС) – это контагиозное респираторное заболевание, которое наносит огромный ущерб животноводству по всему миру, в том числе и в России. РСИ КРС характеризуется катаральной бронхопневмонией, отеком легкого, слизистыми выделениями из носа, угнетением общего состояния животного и отсутствием аппетита. Наиболее восприимчивыми являются телята первого года жизни [1, 6, 7]. Согласно данным, опубликованным на официальном сайте Россельхознадзора, серопревалентность животных к РСИ КРС составила 78,9% от общего числа исследованных проб. В период с 2017 по 2018 г. циркуляцию вируса РСИ КРС отмечали в молочных хозяйствах, не практикующих вакцинацию. По результатам исследований, проведенных в референтной лаборатории болезней КРС ФГБУ «ВНИИЗЖ», количество выявленных положительных проб в этих хозяйствах составило 60%. На основании вышеизложенного можно заключить, что изучение биологических свойств вируса РСИ КРС, а также разработка средств диагностики и профилактики данного заболевания являются актуальной задачей.

Эффективность мер борьбы с РСИ КРС зависит от точности и скорости диагностики. Диагноз ставят на основании эпизоотических данных, клинических признаков, патологоанатомического вскрытия и подтверждают лабораторными исследованиями. При постановке диагноза необходимо исключить такие заболевания, как инфекционный ринотрахеит (ИРТ), вирусную диарею (ВД КРС), парагрипп-3 (ПГ-3), рота- и коронавирусные инфекции КРС [6, 7]. Для диагностики РСИ КРС используют иммуноферментный анализ (ИФА), полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и выделение вируса в культуре клеток.

До настоящего времени в России основным способом диагностики РСИ КРС является выделение вируса из проб биологического материала в культуре клеток с последующей идентификацией его в реакции нейтрализации. По данным отечественных авторов, чувствительными к вирусу РСИ КРС считаются такие культуры клеток, как диплоидные культуры клеток легкого (Л<sub>5</sub>Э) и почки эмбриона (П<sub>5</sub>Э) коровы, перевиваемые линии почки эмбриона овцы (FLK), почки теленка (Т-1, ПТ) и первично трипсинизированная культура клеток легкого эмбриона коровы (ЛЭК) [3, 5]. Выделение вируса РСИ КРС затруднено ввиду его чрезвычайной лабильности и возможно только на ранней стадии инфекции; вероятность выделения снижается с появлением признаков заболевания. Из-за сложности выделения и культивирования также затруднено получение достаточного количества вирусного материала с высокой инфекционной активностью.

В связи с этим актуальным является изучение культуральных свойств возбудителя с целью выбора наиболее технологичных приемов конструирования средств диагностики и профилактики данного заболевания.

Целью настоящей работы явилось изучение культуральных свойств вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908» и степени его накопления в различных системах культивирования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали штамм «АБ 1908», адаптированный к перевиваемой культуре клеток слизистой носовых перегородок КРС (ВТ, АТСС, США).

Для проведения исследований были выбраны: перевиваемая линия клеток слизистой носовых перегородок эмбриона КРС (FBN), перевиваемая культура клеток слизистой носовых перегородок КРС (ВТ), перевиваемая культура клеток почки макаки-резуса (МА-104), перевиваемая линия клеток почки теленка (RBT) [2], перевиваемая линия клеток трахеи эмбриона коровы (FBT), первично трипсинизированная культура клеток почки барана (ПБ). Чувствительность культуры клеток к вирусу РСИ КРС определяли методом последовательных пассажей. С этой целью монослойную культуру клеток без признаков дегенерации, после отмывки монослоя раствором Хенкса, заражали вирусом РСИ КРС с предварительной адсорбцией на клетках. После 60-минутного контакта вируса с клетками заливали поддерживающую среду ПСП с 10%-м содержанием сыворотки крови КРС и культивировали при температуре  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ . Инфицированную культуру ежедневно просматривали под микроскопом на наличие характерных морфологических изменений клеток.

Инфекционную активность вируса РСИ КРС определяли в культуре клеток ВТ методом микротитрования стандартным способом. Заключительный учет результатов титрования вируса проводили через 6–7 сут инкубирования при условии сохранения целостности монослоя клеток в контрольных лунках.

Расчет инфекционной активности проводили по методу Рида и Менча и выражали в  $\text{lg TCD}_{50}/\text{см}^3$ . Геном вируса РСИ КРС выявляли с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), используя коммерческий набор «Рибо-Сорб», (AmpliSens, Россия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения культуральных свойств вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908» было проведено 5 последовательных пассажей в различных культурах клеток. Результаты исследований приведены в таблице 1.

Из представленных в таблице 1 данных видно, что уровень накопления вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908» в различных клеточных системах был неодинаков.

Культивирование вируса в культурах клеток ПБ и FBN привело к постепенному снижению его активности, при проведении 2–3 пассажей титр вируса находился в пределах от  $2,68 \pm 0,13$  до  $1,13 \pm 0,08 \text{ lg TCD}_{50}/\text{см}^3$ . Время культивирования составляло 7 сут.

При культивировании вируса в культуре клеток МА-104 наблюдали минимальное накопление вируса только на уровне 1-го пассажа ( $1,05 \pm 0,30 \text{ lg TCD}_{50}/\text{см}^3$ ). Далее вирус не регистрировали.

Высокое накопление вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908» было отмечено в культурах клеток ВТ, RBT и FBT уже с 1-го пассажа. Титр вируса в данных системах был в пределах  $4,33 \pm 0,16$ – $4,66 \pm 0,12$ ,  $4,33 \pm 0,33$ – $4,7 \pm 0,36$ ,  $4,13 \pm 0,20$ – $4,78 \pm 0,17 \text{ lg TCD}_{50}/\text{см}^3$  соответственно.

В ходе исследований было отмечено, что цитопатическое действие (ЦПД) вируса РСИ КРС в культурах

**Таблица 1**  
Репродукция вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908» в культурах клеток ( $n = 3$ )

| Культура клеток | Номер пассажа | Время культивирования, сут | Титр инфекционной активности, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ | Наличие генома вируса в ОТ-ПЦР |
|-----------------|---------------|----------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| BT              | 1             | 10                         | $4,33 \pm 0,16$                                                 | +                              |
|                 | 2             | 7                          | $4,63 \pm 0,13$                                                 | +                              |
|                 | 3             | 5–6                        | $4,66 \pm 0,12$                                                 | +                              |
|                 | 4             | 5                          | $4,66 \pm 0,12$                                                 | +                              |
|                 | 5             | 5                          | $4,50 \pm 0,25$                                                 | +                              |
| RBT             | 1             | 10                         | $4,33 \pm 0,33$                                                 | +                              |
|                 | 2             | 7                          | $4,36 \pm 0,11$                                                 | +                              |
|                 | 3             | 5–6                        | $4,66 \pm 0,33$                                                 | +                              |
|                 | 4             | 5                          | $4,70 \pm 0,36$                                                 | +                              |
|                 | 5             | 6                          | $4,66 \pm 0,33$                                                 | +                              |
| FBT             | 1             | 10                         | $4,25 \pm 0,10$                                                 | +                              |
|                 | 2             | 7                          | $4,33 \pm 0,80$                                                 | +                              |
|                 | 3             | 5–6                        | $4,78 \pm 0,05$                                                 | +                              |
|                 | 4             | 5                          | $4,13 \pm 0,20$                                                 | +                              |
|                 | 5             | 6                          | $4,78 \pm 0,17$                                                 | +                              |
| ПБ              | 1             | 7                          | $2,68 \pm 0,13$                                                 | +                              |
|                 | 2             | 7                          | $2,05 \pm 0,14$                                                 | +                              |
|                 | 3             | 7                          | $1,67 \pm 0,10$                                                 | +                              |
|                 | 4             | 7                          | н/о                                                             | +                              |
|                 | 5             | 7                          | н/о                                                             | –                              |
| FBN             | 1             | 7                          | $1,26 \pm 0,03$                                                 | +                              |
|                 | 2             | 7                          | $1,13 \pm 0,08$                                                 | +                              |
|                 | 3             | 7                          | н/о                                                             | –                              |
| МА-104          | 1             | 7                          | $1,05 \pm 0,30$                                                 | +                              |
|                 | 2             | 7                          | н/о                                                             | –                              |

н/о – не обнаружено.

клеток было различным (рис. 1–6). Так, в культуре BT к 5-му пассажу через 2–3 сут культивирования наблюдали округление клеток, к 4–5-м сут – слияние клеточных мембран, а к 5–6-м сут – образование синцитиев, фрагментацию, разрыв монослоя и отделение клеток от стекла (рис. 1–2).

В культурах клеток FBT и RBT наблюдали схожую картину ЦПД вируса: образование нечетких симпластов и конгломератов (рис. 3–6). В данных клеточных линиях к 5-му пассажу на 2–3 сут культивирования отмечали деформацию отдельных клеток, к 3–5-м сут – образование выраженных локализованных очагов поражения

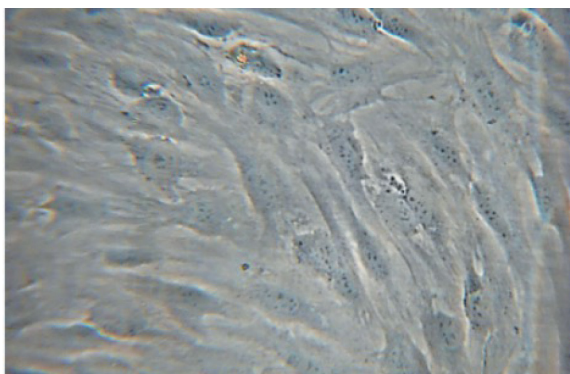


Рис. 1. Монослой незараженной культуры клеток BT на 6-е сут (увеличение  $\times 400$ )

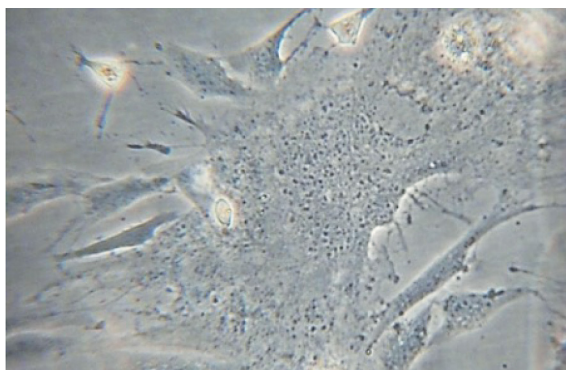


Рис. 2. Клетки монослоя BT после инфицирования вирусом РСИ КРС через 6 сут (увеличение  $\times 400$ )

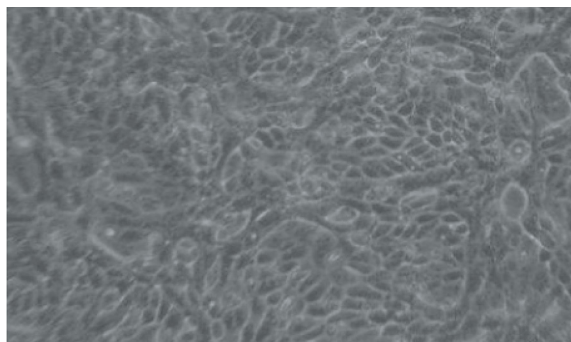


Рис. 3. Монослой незараженной культуры клеток RBT на 6-е сут (увеличение  $\times 400$ )

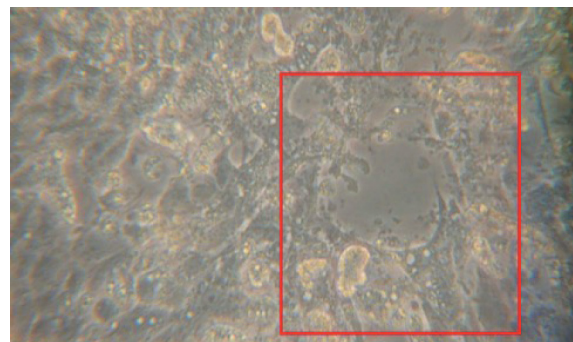


Рис. 4. Клетки моноосля RBT после инфицирования вирусом РСИ КРС через 6 сут (увеличение  $\times 400$ )

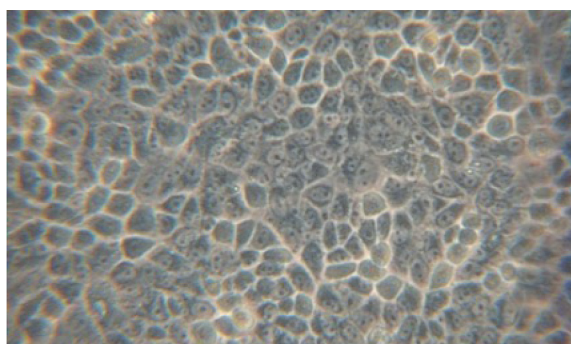


Рис. 5. Монослой незараженной культуры клеток FBT на 6-е сут (увеличение  $\times 400$ )

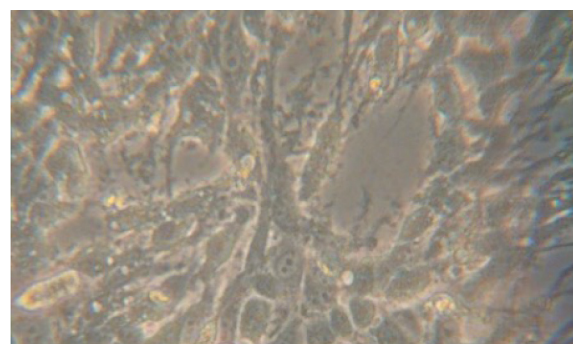


Рис. 6. Клетки моноосля FBT после инфицирования вирусом РСИ КРС через 6 сут (увеличение  $\times 400$ )

клеток, к 6–7-м сут – образование симпластов и конгломератов.

Нужно отметить, что из всех испытанных культур клеток наиболее подходящими для репродукции вируса РСИ КРС оказались клеточные системы BT, FBT и RBT гомологичного происхождения. Культуры клеток BT и FBT произошли из тканей дыхательной системы и являются явно перmissive. Клеточная линия RBT, полученная из почки КРС, также оказалась чувствительной к изучаемому вирусу.

Следующим этапом работы являлось определение посевной концентрации клеток BT, FBT и RBT, которая наиболее подходит для максимальной репродукции вируса (табл. 2). Для этого использовали посевную концентрацию клеток в диапазоне от 100 до 400 тыс./см<sup>3</sup>. Культуры клеток выращивали в течение 1 сут при  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ , множественность заражения составила 0,1 ТЦД<sub>50</sub>/кл. Активность вируса учитывали по лизису клеток в суспензии исследуемой культуры, а также методом титрования в культуре клеток BT. Результаты представлены в таблице 2.

Как видно из данных, представленных в таблице 2, максимальное накопление вируса в культуре клеток BT отмечали при посевной концентрации 100–200 тыс./см<sup>3</sup>. Титр вируса в данной культуре составлял  $4,25 \pm 0,44 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ . Наибольшая активность вируса в культурах клеток RBT и FBT была при посевной концентрации 200–300 тыс./см<sup>3</sup> –  $3,78 \pm 0,13$  –  $4,25 \pm 0,25$  и  $3,62 \pm 0,13$  –  $4,54 \pm 0,24 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  соответственно.

Таким образом, оптимальной посевной концентрацией для клеток BT является 100 тыс./см<sup>3</sup>, для RBT и FBT – 200–300 тыс./см<sup>3</sup>.

На следующем этапе работы изучали влияние возраста культуры на инфекционную активность вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908». С этой целью были выбраны культуры клеток с наибольшим уровнем накопления вируса (BT, RBT, FBT). Результаты проведенных исследований представлены в таблице 3.

Как видно из таблицы 3, в сформировавшемся к 1–2-м сут моноослой культуры клеток BT, RBT и FBT вирус РСИ КРС штамма «АБ 1908» репродуцировался в титрах  $4,75 \pm 0,06$ ;  $4,50 \pm 0,25$  и  $4,63 \pm 0,05 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$

**Таблица 2**

**Влияние посевной концентрации клеток BT, FBT и RBT на репродукцию вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908» ( $n = 3$ )**

| Посевная концентрация клеток, тыс./см <sup>3</sup> | Время культивирования, сут | Титр вируса, $\text{lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ |                 |                 |
|----------------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------------------|-----------------|-----------------|
|                                                    |                            | BT                                            | FBT             | RBT             |
| 100                                                | 6                          | $4,25 \pm 0,44$                               | $3,33 \pm 0,23$ | $3,33 \pm 0,33$ |
| 200                                                | 5                          | $4,25 \pm 0,25$                               | $3,62 \pm 0,13$ | $3,78 \pm 0,13$ |
| 300                                                | 5                          | $3,78 \pm 0,33$                               | $4,54 \pm 0,24$ | $4,25 \pm 0,25$ |
| 400                                                | 6                          | $2,70 \pm 0,10$                               | $3,33 \pm 0,30$ | $3,16 \pm 0,16$ |

Таблица 3

Влияние возраста культуры клеток на инфекционную активность вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908» ( $n = 3$ )

| Возраст культуры, сут | Время культивирования, сут | Титр вируса, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ |                 |                 |
|-----------------------|----------------------------|------------------------------------------------|-----------------|-----------------|
|                       |                            | BT                                             | RBT             | FBT             |
| 1                     | 6                          | $4,75 \pm 0,06$                                | $4,25 \pm 0,11$ | $4,50 \pm 0,17$ |
| 2                     | 7                          | $4,25 \pm 0,11$                                | $4,50 \pm 0,25$ | $4,63 \pm 0,05$ |
| 3                     | 10                         | $4,00 \pm 0,25$                                | $4,00 \pm 0,22$ | $3,83 \pm 0,15$ |
| 4                     | 10                         | $3,33 \pm 0,33$                                | $3,21 \pm 0,11$ | $3,23 \pm 0,11$ |

Таблица 4

Определение влияния множественности заражения на активность вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908» ( $n = 3$ )

| Доза заражения, $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$ | Время культивирования, сут | Титр вируса, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ |                 |                 |
|---------------------------------------------|----------------------------|------------------------------------------------|-----------------|-----------------|
|                                             |                            | BT                                             | RBT             | FBT             |
| 0,001                                       | 7–10                       | $3,63 \pm 0,20$                                | $3,33 \pm 0,30$ | $3,16 \pm 0,16$ |
| 0,01                                        | 6–8                        | $4,16 \pm 0,16$                                | $4,00 \pm 0,25$ | $4,00 \pm 0,19$ |
| 0,1                                         | 5–6                        | $4,33 \pm 0,10$                                | $4,54 \pm 0,10$ | $4,33 \pm 0,33$ |

соответственно. А при инокуляции вируса в 3–4-суточные культуры репродукция вируса снижалась и составила в среднем  $3,66 \pm 0,29$  (BT);  $3,60 \pm 0,16$  (RBT) и  $3,53 \pm 0,13 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  (FBT). Снижение инфекционной активности вируса может быть связано со снижением процессов обмена веществ клеток с внешней средой, которые протекают активнее на начальной стадии роста монослоя. Таким образом, наиболее оптимальным возрастом культур клеток BT, RBT и FBT для инокуляции вируса является 1–2 сут.

При исследовании культуральных свойств вируса важным является определение множественности заражения. Исходя из этого, следующим этапом работы стало определение влияния множественности заражения на цитопатическую активность вируса в культурах клеток BT, RBT и FBT. Для этого использовали дозы заражения 0,001; 0,01 и 0,1  $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$ . Инкубацию вируса прекращали при 90%-м разрушении клеток и отслоении их от стекла. Цитопатическую активность проверяли методом микротитрования в культуре клеток BT. Результаты представлены в таблице 4.

Как видно из таблицы 4, цитопатическая активность вируса при множественности заражения 0,1  $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$  составила  $4,33 \pm 0,10 \text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$  в культуре клеток BT,  $4,54 \pm 0,10 \text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$  в культуре клеток RBT,  $4,33 \pm 0,33 \text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$  в культуре клеток FBT. При более низких дозах заражения (0,01 и 0,001  $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$ ) инфекционная активность вируса уменьшалась и составила  $3,16 \pm 0,16$ – $4,16 \pm 0,16 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ , а время проявления ЦПД увеличивалось от 6 до 10 сут.

Таким образом, оптимальная доза заражения культур клеток вирусом равна 0,1  $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$ . Заражение культур клеток малой концентрацией вируса (0,001 и 0,01  $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$ ) замедляет процесс репродукции вируса и снижает его цитопатическую активность.

На следующем этапе работы изучали влияние времени культивирования на репродукцию вируса РСИ

КРС, используя для этого суточные культуры клеток BT, FBT и RBT. Вирус культивировали в течение 1–6 сут. Интенсивность размножения вируса учитывали по ЦПД на клетки, его активность определяли методом титрования в культуре клеток BT.

Установлено, что наиболее высокий выход вируса в культурах клеток BT, FBT и RBT происходит при его репродукции в течение 4–6 сут, о чем свидетельствуют данные, представленные в таблице 5. При этом максимальный уровень накопления вируса составил от  $3,33 \pm 0,23$  до  $4,75 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ . При культивировании вируса в течение 1–3 сут титр вируса был в диапазоне от  $2,00 \pm 0,16$  до  $2,70 \pm 0,10 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ .

Для получения опытных образцов культурального вируса РСИ КРС было проведено три последовательных пассажа по оптимизированной схеме культивирования: клеточная система – BT, FBT или RBT, возраст культуры – 1 сут.; посевная концентрация – 100 тыс. кл./ $\text{см}^3$  для BT, 200–300 тыс. кл./ $\text{см}^3$  для FBT и RBT; множественность заражения – 0,1  $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$ ; время сбора вирусного материала – 6 сут.

На 1-м пассаже ЦПД вируса в культуре BT проявлялось в виде округления клеток к 3–4-м сут культивирования, слияние клеточных мембран с образованием симпластов происходило к 4–6-м сут, возникновение конгломератов и синцитиев – к 6–7-м сут. В культурах клеток FBT и RBT к 6-м сут отмечалось разрыхление монослоя и частичное отслоение клеток в суспензию. При этом титр инфекционной активности составил  $3,78 \pm 0,33$ ;  $3,33 \pm 0,13$  и  $3,63 \pm 0,33 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  для культур клеток BT, FBT и RBT соответственно. На 2-м пассаже картина ЦПД вируса практически не изменилась. Однако к 3-му пассажу происходило образование конгломератов и синцитиев к 4–6-м сут во всех исследуемых клеточных системах. Результаты представлены в таблице 6.

Таким образом, представленные культуры клеток являются чувствительными биологическими

**Таблица 5**  
Влияние времени культивирования на репродукцию вируса РСИ КРС ( $n = 3$ )

| Время культивирования, сут | Возраст культуры, сут | Титр вируса, $\lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$ |                 |                 |
|----------------------------|-----------------------|-------------------------------------------------|-----------------|-----------------|
|                            |                       | BT                                              | FBT             | RBT             |
| 1                          | 1                     | $2,23 \pm 0,10$                                 | $2,00 \pm 0,16$ | $2,16 \pm 0,16$ |
| 2                          |                       | $2,54 \pm 0,08$                                 | $2,23 \pm 0,10$ | $2,22 \pm 0,11$ |
| 3                          |                       | $2,70 \pm 0,10$                                 | $2,33 \pm 0,33$ | $2,54 \pm 0,24$ |
| 4                          |                       | $3,78 \pm 0,33$                                 | $3,33 \pm 0,23$ | $3,33 \pm 0,33$ |
| 5                          |                       | $4,25 \pm 0,44$                                 | $3,62 \pm 0,13$ | $3,78 \pm 0,13$ |
| 6                          |                       | $4,75 \pm 0,25$                                 | $4,54 \pm 0,24$ | $4,25 \pm 0,25$ |

**Таблица 6**  
Инфекционная активность вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908» на различных пассажах ( $n = 3$ )

| Номер пассажа | Культура клеток | Время проявления ЦПД, сут | Инфекционная активность, $\lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$ |
|---------------|-----------------|---------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 1             | BT              | 4                         | $3,78 \pm 0,33$                                             |
|               | FBT             | 5                         | $3,33 \pm 0,13$                                             |
|               | RBT             | 5                         | $3,63 \pm 0,33$                                             |
| 2             | BT              | 4                         | $4,0 \pm 0,25$                                              |
|               | FBT             | 5                         | $3,63 \pm 0,12$                                             |
|               | RBT             | 5                         | $3,75 \pm 0,25$                                             |
| 3             | BT              | 4                         | $4,75 \pm 0,06$                                             |
|               | FBT             | 6                         | $4,67 \pm 0,17$                                             |
|               | RBT             | 6                         | $4,65 \pm 0,25$                                             |

системами для вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908», титр вируса в культуре клеток BT был на уровне  $3,78 \pm 0,33 - 4,75 \pm 0,06 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$ , в культуре клеток RBT –  $3,63 \pm 0,33 - 4,65 \pm 0,25 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$  и в культуре клеток FBT –  $3,33 \pm 0,13 - 4,67 \pm 0,17 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При изучении культуральных свойств вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908» установлено, что чувствительными биологическими системами для его репродукции являются культуры клеток BT, RBT и FBT гомологичного происхождения. Культуры клеток МА-104, ПБ и FBN оказались непригодными для репродукции вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908». Вирус в культуре клеток BT накапливался в пределах  $4,33 \pm 0,16 - 4,66 \pm 0,12 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$ , в культуре клеток RBT –  $4,33 \pm 0,33 - 4,7 \pm 0,36 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$  и культуре клеток FBT –  $4,13 \pm 0,20 - 4,78 \pm 0,17 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$ . Оптимальными условиями культивирования вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908» в изучаемых клеточных линиях являлось: посевная концентрация  $100 \text{ тыс.}/\text{cm}^3$  – для BT,  $200-300 \text{ тыс.}/\text{cm}^3$  – для FBT и RBT; время выращивания культур клеток – 1–2 сут, множественность заражения –  $0,1 \text{ TCID}_{50}/\text{кл}$ , время сбора вирусного материала – 6–7-е сут культивирования.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Журавлева Е. А. Нозоареал респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота // Ветеринария. – 2018. – № 12. – С. 3–8; DOI: 10.30896/0042-4846.2018.21.12.03-08.
- Пат. 2488631 Российская Федерация, МПК<sup>7</sup> А61К39/12. Линия клеток почки теленка *Bos taurus* RBT (Rene Bos Taurus) для репродукции вирусов животных / Б. Л. Манин, Н. В. Коропова, Е. Г. Кузнецова [и др.]; ФГБУ «ВНИИЗЖ». – № 2012126700/10; заявл. 26.06.2012; опубл. 27.07.2013.
- Сергеев В. А. Репродукция и выращивание вирусов животных. – М.: Колос, 1976. – 303 с.
- Строганова И. Я. Особенности эпизоотической ситуации по вирусным респираторным болезням крупного рогатого скота в Восточной Сибири // Вестник КрасГАУ. – 2011. – № 1. – С. 125–128.
- Строганова И. Я., Войтова К. В. Методы обнаружения и идентификации респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота в культуре клеток // Вестник КрасГАУ. – 2011. – № 3. – С. 128–133.
- Pathogens, patterns of pneumonia, and epidemiologic risk factors associated with respiratory disease in recently weaned cattle in Ireland / G. M. Murray, S. J. More, D. Sammin [et al.] // J. Vet. Diagn. Invest. – 2017. – Vol. 29 (1). – P. 20–34; DOI: 10.1177/1040638716674757.
- Valarcher J.-F., Taylor G. Bovine respiratory syncytial virus infection // Vet. Res. – 2007. – Vol. 38 (2). – P. 153–180; DOI: 10.1051/vetres:2006053.

## REFERENCES

- Zhuravleva Ye. A. Nosoarea of bovine respiratory syncytial infection [Nosoareal respiratorno-sincitjal'noj infekcii krupnogo rogatogo skota]. *Veterinariya*. 2018; 12: 3–8; DOI: 10.30896/0042-4846.2018.21.12.03-08 (in Russian).
- Pat. 2488631 Russian Federation, MPK<sup>7</sup> A61K39/12. *Bos taurus* calf kidney cells RBT (Rene Bos Taurus) for animal virus reproduction [Linia kletok pochki telenka *Bos taurus* RBT (Rene Bos Taurus) dlya reprodukcii virusov zhivotnyh]. B. L. Manin, N. V. Koropova, Ye. G. Kuznetsova [et al.]; FGBI "ARRIAH". No. 2012126700/10; appl. on 26.06.2012; publ. on 27.07.2013 (in Russian).
- Sergeyev V. A. Reproduction and cultivation of animal viruses [Reprodukcija i vyrashchivanie virusov zhivotnyh]. M.: Kolos, 1976 (in Russian).
- Stroganova I. Ya. Epizootic situation peculiarities on the cattle virus respiratory diseases in the Eastern Siberia [Osobennosti epizooticheskoy situacii po virusnym respiratornym boleznyam krupnogo rogatogo skota v vostochnoj Sibiri]. *Bulletin of KrasGAU*. 2011; 1: 125–128 (in Russian).
- Stroganova I. Ya., Voitova K. V. The techniques for revealing and identification of the respiratory and syncytial virus of cattle in cell culture [Metody obnaruzheniya i identifikacii respiratorno-sincitjal'nogo virusa krupnogo rogatogo skota v kul'ture kletok]. *Bulletin of KrasGAU*. 2011; 3: 128–133 (in Russian).
- Pathogens, patterns of pneumonia, and epidemiologic risk factors associated with respiratory disease in recently weaned cattle in Ireland. G. M. Murray, S. J. More, D. Sammin [et al.]. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2017; 29 (1): 20–34; DOI: 10.1177/1040638716674757.
- Valarcher J.-F., Taylor G. Bovine respiratory syncytial virus infection. *Vet. Res.* 2007; 38 (2): 153–180; DOI: 10.1051/vetres:2006053.

Поступила 22.08.19  
Принята в печать 09.12.19

# ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ИНАКТИВИРОВАННЫХ АНТИРАБИЧЕСКИХ ВАКЦИН ИЗ ШТАММА «ВНИИЗЖ» С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗНЫХ АДЬЮВАНТОВ

А. Н. Балашов<sup>1</sup>, Д. А. Лозовой<sup>2</sup>, А. В. Борисов<sup>3</sup>, Д. В. Михалишин<sup>4</sup>, М. И. Доронин<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Ведущий технолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: balashov@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-7597-6698

<sup>2</sup> Заместитель директора по НИР и развитию, доктор ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: lozovoy@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-5983-7062

<sup>3</sup> Ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: borisov@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-9880-9657

<sup>4</sup> Заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: mihalishindv@arriah.ru; ORCID ID 0000-0003-1718-1955

<sup>5</sup> Научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: doronin@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-4682-6559

## РЕЗЮМЕ

На территории Российской Федерации продолжают регистрировать случаи бешенства среди разных видов млекопитающих. Источником и резервуаром природного бешенства являются дикие плотоядные, которые при контакте передают возбудитель домашним и сельскохозяйственным животным. Наибольшее количество случаев инфицирования вирусом бешенства в группе сельскохозяйственных животных отмечают среди крупного рогатого скота. Так, в 2017 г. в Российской Федерации зафиксировано 158 новых очагов инфекции, в которых вирус был выявлен именно у крупного рогатого скота. В современных условиях в системе ветеринарно-санитарных мероприятий против бешенства одно из ведущих мест занимает специфическая профилактика, а также оценка ее эффективности по уровню накопления антирабических вируснейтрализующих антител. В статье приведены результаты исследований по изучению иммунобиологических свойств трех инактивированных антирабических вакцин из штамма «ВНИИЗЖ», которые предназначены для профилактики бешенства крупного рогатого скота. Показано, что сорбированная

и две эмульсионные вакцины против бешенства, разработанные с применением различных адъювантов (гель гидрата окиси алюминия, Montanide ISA 206 и Montanide ISA 70), являются авирулентными и безвредными при тестировании на белых мышах и крупном рогатом скоте. Все экспериментальные антирабические вакцины, изготовленные из штамма «ВНИИЗЖ», стимулируют формирование поствакцинального иммунитета у всех привитых животных уже на 21 сут после введения. Средние значения титра антирабических антител составили: для инактивированной сорбированной –  $4,02 \pm 0,76$  МЕ/см<sup>3</sup>; для инактивированных эмульсионных –  $16,30 \pm 2,03$  и  $20,73 \pm 3,39$  МЕ/см<sup>3</sup>. По сравнению с сорбированной вакциной эмульсионные препараты на основе адъювантов Montanide ISA 206 и ISA 70 индуцируют более напряженный иммунитет.

**Ключевые слова:** бешенство, поствакцинальный иммунитет, антирабические вируснейтрализующие антитела, инактивированная сорбированная и эмульсионная вакцины против бешенства, крупный рогатый скот.

UDC 619:578.824:11:636.22/.28:615.371

# ASSESSMENT OF EFFICACY AND SAFETY OF INACTIVATED RABIES VACCINES BASED ON "ARRIAH" STRAIN AND FORMULATED WITH DIFFERENT ADJUVANTS IN CATTLE

A. N. Balashov<sup>1</sup>, D. A. Lozovoy<sup>2</sup>, A. V. Borisov<sup>3</sup>, D. V. Mikhilishin<sup>4</sup>, M. I. Doronin<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Leading Technologist, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: balashov@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-7597-6698

<sup>2</sup> Deputy Head for Research and Development, Doctor of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: lozovoy@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-5983-7062

<sup>3</sup> Leading Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: borisov@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-9880-9657

<sup>4</sup> Head of Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: mihalishindv@arriah.ru; ORCID ID 0000-0003-1718-1955

<sup>5</sup> Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: doronin@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-4682-6559

## SUMMARY

Rabies cases are still reported in various mammal species in the Russian Federation. Wild carnivores contacting with domestic and farm animals and transmitting the pathogen to them are the main source and natural reservoirs of rabies. The highest level of rabies incidence in livestock is observed among cattle. Thus, 158 new outbreaks were reported in the Russian Federation in 2017 where the virus was identified in cattle. Rabies specific prophylaxis as well as assessment of its efficacy based on the level of accumulated anti-rabies virus neutralizing antibodies currently occupy one of the leading positions in the modern system of veterinary and sanitary measures against rabies. The paper presents the study results confirming efficacy and safety of three inactivated rabies vaccines based

on the "ARRIAH" strain and intended for rabies prevention in cattle. The adsorbed and two emulsion rabies vaccines, formulated with different adjuvants demonstrated innocuity and safety, and induced post-vaccination immunity in all immunized animals at day 21 post inoculation. The mean titers of anti-rabies antibodies were as follows: for inactivated adsorbed vaccine –  $4.02 \pm 0.76$  IU/cm<sup>3</sup>; for inactivated emulsion vaccines –  $16.30 \pm 2.03$  and  $20.73 \pm 3.39$  IU/cm<sup>3</sup>. As compared with the adsorbed vaccine, the emulsion vaccines formulated with Montanide ISA 206 and ISA 70 adjuvants induce stronger immunity.

**Key words:** rabies, post-vaccination immunity, anti-rabies virus-neutralizing antibodies, inactivated adsorbed and emulsion vaccines against rabies, cattle.

## ВВЕДЕНИЕ

Бешенство (*Rabies*) является остро протекающим вирусным заболеванием млекопитающих, которое характеризуется поражением центральной нервной системы, энцефаломиелитами, параличами с неизбежным летальным исходом. В соответствии с классификацией Международного комитета по таксономии вирусов возбудитель принадлежит к порядку *Mononegavirales*, семейству *Rhabdoviridae*, роду *Lyssavirus* [16].

Ежегодно в мире от бешенства погибает более 50 тысяч человек и свыше миллиона животных. В настоящее время Российская Федерация остается страной, неблагополучной по данному заболеванию. На территории государства продолжают регистрировать случаи бешенства среди разных видов млекопитающих, в том числе крупного рогатого скота (КРС), мелкого рогатого скота, свиней, лошадей, собак, кошек, диких плотоядных животных и т. д. [13]. Источником и резервуаром природного бешенства являются дикие плотоядные, которые при контакте передают возбудитель домашним и сельскохозяйственным животным [6]. Наибольшее количество случаев инфицирования вирусом бешенства в группе сельскохозяйственных животных отмечают среди КРС [13]. Так, в 2017 г. в РФ зафиксировано 158 новых очагов инфекции, в которых вирус был выявлен именно у КРС [14].

В современных условиях в системе ветеринарно-санитарных мероприятий против бешенства одно из ведущих мест занимает специфическая профилактика, а также оценка ее эффективности по уровню накопления антирабических вируснейтрализующих антител (ВНА) [4, 10, 12]. Правильное и своевременное проведение вакцинации позволяет сдерживать распространение болезни и существенно снижать возможные экономические потери. Для профилактики бешенства применяют как живые, так и инактивированные вакцины [2, 7, 9, 11]. Основным способом борьбы с инфекцией в природе считается оральная антирабическая вакцинация, эффективность и надежность которой при правильном осуществлении не вызывает сомнений [3, 4].

Для профилактики и предотвращения распространения вируса бешенства среди домашних и сельскохозяйственных животных применяют культуральные и инактивированные вакцины из различных штаммов вируса [2, 4, 9]. При разработке антирабических вакцин особое внимание уделяют их безопасности и эффективности. Для формирования напряженного и продолжительного иммунитета у привитых животных в качестве неспецифических стимуляторов иммуногенеза используют широкий спектр адъювантов, в частности гель гидрата окиси алюминия (ГОА) – при изготовлении сорбированных вакцин, масляные адъюванты – при производстве эмульсионных препаратов [1, 8].

Целью данной работы было изучение эффективности и безопасности применения для КРС антирабических инактивированных вакцин из штамма «ВНИИЗЖ» с использованием различных адъювантов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Вакцины.** Экспериментальные серии антирабических вакцин получали на основе вируса бешенства штамма «ВНИИЗЖ», репродуцированного в суспензионной клеточной субкультуре из почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/2-17b). Инактивацию вируса бешенства проводили с использованием раствора аминоэтилэтиленимина (АЭЭИ). Для очистки суспензии инактивированного антигена вируса от балластных белков применяли раствор полигексаметиленгуанидина (ПГМГ). В качестве адъюванта использовали ГОА (ФГБУ «ВНИИЗЖ», Россия) и ряд масляных адъювантов Montanide (SEPPIC, Франция). Характеристика опытных образцов вакцин представлена в таблице 1.

**Животные.** Для изучения поствакцинального иммунитета использовали 45 голов КРС черно-пестрой породы массой 250–300 кг в возрасте 9–12 месяцев.

Оценку авирулентности и безвредности антирабических вакцин проводили на белых мышах массой 10–12 г в количестве 90 особей.

Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с межгосударственными стандартами по содержанию и уходу за лабораторными животными ГОСТ 33216-2014 и ГОСТ 33215-2014, принятыми Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации, а также согласно требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2012 по охране животных, используемых в научных целях.

**Определение титра инфекционной активности вируса бешенства.** Инфекционную активность вируса бешенства определяли с помощью высокочувствительной монослойной клеточной линии нейробластомы мыши (N2a) с последующим окрашиванием антирабическим иммуноглобулином, меченным флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ). Значения титра вируса вычисляли с применением метода Спирмана-Кербера [15].

**Иммунизация животных.** Для проведения исследования КРС разделили на три группы по 10 голов в каждой. Животных первой группы иммунизировали инактивированной сорбированной вакциной подкожно в прививной дозе 5 см<sup>3</sup>, второй – инактивированной эмульсионной вакциной, полученной с применением адъюванта Montanide ISA 206, в дозе 2 см<sup>3</sup>, третьей – инактивированной эмульсионной вакциной, изготовленной с использованием адъюванта Montanide ISA 70,

**Таблица 1**  
Антирабические вакцины на основе разных адъювантов, разработанные для иммунизации КРС

| Номер образца | Тип вакцины                    | Адъювант          | Соотношение адъювант/антиген | Тип эмульсии |
|---------------|--------------------------------|-------------------|------------------------------|--------------|
| 1             | инактивированная сорбированная | ГОА               | 90/10                        | –            |
| 2             | инактивированная эмульсионная  | Montanide ISA 206 | 50/50                        | W/O/W        |
| 3             | инактивированная эмульсионная  | Montanide ISA 70  | 70/30                        | W/O          |

W/O – вода/масло (обратная эмульсия);

W/O/W – вода/масло/вода (множественная эмульсия).

Таблица 2

Иммунизация КРС инактивированными антирабическими вакцинами на основе штамма «ВНИИЗЖ» с применением разных адъювантов

| Номер образца | Наименование вакцины           |                   | Номер животных | Прививная доза, см <sup>3</sup> | Способ введения |
|---------------|--------------------------------|-------------------|----------------|---------------------------------|-----------------|
|               | тип                            | адъювант          |                |                                 |                 |
| 1             | инактивированная сорбированная | ГОА               | 1–10           | 5                               | подкожно        |
| 2             | инактивированная эмульсионная  | Montanide ISA 206 | 11–20          | 2                               | внутримышечно   |
| 3             | инактивированная эмульсионная  | Montanide ISA 70  | 21–30          | 2                               | внутримышечно   |

в дозе 2 см<sup>3</sup>. Все представленные вакцинные препараты вводили однократно в цельном виде (табл. 2).

**Определение количества антирабических ВНА.** Основным методом оценки напряженности поствакцинального антирабического иммунитета у животных, рекомендованным МЭБ, является реакция нейтрализации в монослойной культуре клеток ВНК-21/2-17b (FAVN – fluorescent antibody virus neutralization). FAVN проводили согласно Руководству МЭБ по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных, значения титра антирабических ВНА выражали в ME/см<sup>3</sup>. В соответствии с международными требованиями защитным является уровень ВНА против вируса бешенства  $\geq 0,5$  ME/см<sup>3</sup> [12, 17]. Сыворотки крови исследовали до вакцинации КРС и на 21 сут после нее.

**Оценка авирулентности антигена вируса бешенства в культуре клеток.** Полноту инактивации вируса бешенства контролировали инокуляцией в монослойную перевиваемую культуру клеток ВНК-21/2-17b в течение трех последовательных пассажей. Суспензию инактивированного вируса бешенства вносили в точную культуру клеток ВНК-21/2-17b и инкубировали при температуре (37,0  $\pm$  0,5) °C в течение 1 часа. После экспозиции монослой омывали средой Игла МЕМ и вносили на поверхность клеток поддерживающую среду с 2% фетальной сыворотки КРС. Культуру клеток выдерживали при температуре (37,0  $\pm$  0,5) °C в течение 4 сут. Далее проводили инкубирование монослоя с антирабическим иммуноглобулином, меченным ФИТЦ, и оценивали наличие или отсутствие специфического для вируса бешенства флуоресцентного свечения. В качестве положительного контроля использовали лиофильно высушенную суспензию неинактивированного вируса бешенства штамма «ВНИИЗЖ» с титром инфекционной активности 7,00 lg TCID<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Отрицательным контролем служила лиофильно высушенная суспензия инактивированного вируса бешенства. Материал считается авирулентным, если ни в одном из трех последовательных пассажей не обнаружено наличие флуоресцентного свечения, специфичного для вируса бешенства.

**Оценка авирулентности антирабических вакцин на белых мышах.** Сорбированную вакцину против бешенства разбавляли физиологическим раствором в 4 раза, полученную суспензию вводили интрацеребрально по 0,03 см<sup>3</sup> 15 белым мышам.

Эмульсионные вакцины перед введением разрушали до выделения антигенной фазы. Для этого их под-

вергали 2–3-кратному замораживанию и оттаиванию, затем центрифугировали в течение 30 мин при 1000 g. Осевший на дне пробирки антиген использовали для испытаний путем интрацеребрального введения животным в объеме 0,03 см<sup>3</sup> (по 15 особей на каждую вакцину). За животными вели наблюдение в течение 21 сут. Вакцина считается авирулентной, если все животные в течение всего срока наблюдения оставались клинически здоровыми – без проявления признаков, характерных для бешенства.

**Оценка безвредности вакцины на белых мышах.** Вакцинные препараты вводили 45 белым мышам (по 15 особей на каждый образец вакцин) внутрибрюшинно в дозе 0,05 см<sup>3</sup> и наблюдали за клиническим состоянием животных в течение 21 сут. Вакцина признается безвредной, если все животные по итогам наблюдения остаются клинически здоровыми (без развития некротических процессов на месте введения препаратов).

**Оценка безвредности вакцины на КРС.** Вакцины вводили 15 животным (по 5 голов на каждый образец) в мышцы шеи в тройной дозе (для сорбированной – 15 см<sup>3</sup>, для эмульсионных – по 6 см<sup>3</sup>). За клиническим состоянием животных наблюдали на протяжении 14 сут. Вакцину считали безвредной при условии, если все животные на протяжении всего срока наблюдения оставались клинически здоровыми – без формирования некроза в области инокуляции.

**Статистическая обработка данных.** Исследования проводили в трех повторениях. Статистическая обработка данных заключалась в определении средних арифметических значений титра антирабических антител и достоверности статистической разницы между средними величинами в соответствии с методом Стьюдента-Фишера [5]. Построение диаграмм проводили с использованием пакета прикладных программ StatSoft (версия 6.0) и Microsoft Excel 2010.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы проводили анализ полученного антигена вируса бешенства на авирулентность в монослойной культуре клеток ВНК-21/2-17b. По итогам исследования ни в одном из трех последовательных пассажей наличия специфического для вируса бешенства флуоресцентного свечения не выявлено, что свидетельствует о проведении полной инактивации антигена. При этом в лунках с положительным контролем отмечали явные признаки репродукции возбудителя бешенства. Монослой в лунках с отрицательным

Таблица 3

Оценка степени поствакцинального иммунитета КРС против бешенства в реакции нейтрализации после введения инактивированных антирабических вакцин с применением разных адъювантов ( $n_{\text{исследований}} = 3, p < 0,005$ )

| Номер образца | Характеристика антирабической вакцины |                   | Номер животного | Титр антирабических ВНА на 21 сут после иммунизации, МЕ/см <sup>3</sup> |
|---------------|---------------------------------------|-------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------|
|               | тип                                   | адъювант          |                 |                                                                         |
| 1             | инактивированная сорбирующая          | ГОА               | 1               | $3,40 \pm 0,15$                                                         |
|               |                                       |                   | 2               | $5,90 \pm 0,12$                                                         |
|               |                                       |                   | 3               | $4,50 \pm 0,21$                                                         |
|               |                                       |                   | 4               | $2,60 \pm 0,14$                                                         |
|               |                                       |                   | 5               | $3,40 \pm 0,15$                                                         |
|               |                                       |                   | 6               | $2,00 \pm 0,13$                                                         |
|               |                                       |                   | 7               | $2,60 \pm 0,18$                                                         |
|               |                                       |                   | 8               | $4,50 \pm 0,11$                                                         |
|               |                                       |                   | 9               | $5,90 \pm 0,12$                                                         |
|               |                                       |                   | 10              | $3,40 \pm 0,09$                                                         |
|               |                                       |                   | $M \pm m$       | $4,02 \pm 0,79^*$                                                       |
| 2             | инактивированная эмульсионная         | Montanide ISA 206 | 11              | $4,50 \pm 0,20$                                                         |
|               |                                       |                   | 12              | $17,80 \pm 0,15$                                                        |
|               |                                       |                   | 13              | $15,90 \pm 0,24$                                                        |
|               |                                       |                   | 14              | $23,40 \pm 0,21$                                                        |
|               |                                       |                   | 15              | $7,80 \pm 0,14$                                                         |
|               |                                       |                   | 16              | $13,50 \pm 0,11$                                                        |
|               |                                       |                   | 17              | $5,90 \pm 0,08$                                                         |
|               |                                       |                   | 18              | $13,50 \pm 0,17$                                                        |
|               |                                       |                   | 19              | $17,80 \pm 0,18$                                                        |
|               |                                       |                   | 20              | $17,80 \pm 0,07$                                                        |
|               |                                       |                   | $M \pm m$       | $16,30 \pm 2,03^*$                                                      |
| 3             | инактивированная эмульсионная         | Montanide ISA 70  | 21              | $23,40 \pm 0,22$                                                        |
|               |                                       |                   | 22              | $17,80 \pm 0,14$                                                        |
|               |                                       |                   | 23              | $23,40 \pm 0,19$                                                        |
|               |                                       |                   | 24              | $15,90 \pm 0,22$                                                        |
|               |                                       |                   | 25              | $17,80 \pm 0,23$                                                        |
|               |                                       |                   | 26              | $10,30 \pm 0,14$                                                        |
|               |                                       |                   | 27              | $23,40 \pm 0,14$                                                        |
|               |                                       |                   | 28              | $23,40 \pm 0,10$                                                        |
|               |                                       |                   | 29              | $13,50 \pm 0,18$                                                        |
|               |                                       |                   | 30              | $30,80 \pm 0,22$                                                        |
|               |                                       |                   | $M \pm m$       | $20,73 \pm 3,39^*$                                                      |

\* Расчет  $M \pm m$  проводили при анализе значений титра ВНА, находящихся в пределах нормального распределения в интервале  $(\bar{x} - 2\sigma; \bar{x} + 2\sigma)$ . Для животных из группы 1 исключение составило значение  $2,0 \text{ МЕ/см}^3$ , из группы 2 –  $4,5; 5,9; 7,8 \text{ МЕ/см}^3$ , из группы 3 –  $10,3$  и  $13,5 \text{ МЕ/см}^3$ .

контролем не был подвержен воздействию вируса бешенства, специфическое флуоресцентное свечение отсутствовало.

На следующем этапе исследования оценивали авирулентность и безвредность трех предложенных вариантов антирабических вакцин на белых мышах и КРС. Все животные, которым был введен препарат, в течение всего срока наблюдения оставались клинически

здоровыми, без проявления признаков бешенства и без формирования некроза тканей на месте введения, поэтому изготовленные вакцины признаны авирулентными и безвредными.

Следующий этап работы был посвящен изучению поствакцинального иммунитета у КРС в ответ на введение антирабических вакцин, изготовленных на основе штамма «ВНИИЗЖ» с разными адъювантами. Сыворотки

крови, полученные до вакцинации животных всех трех групп и спустя 21 сут после нее, исследовали методом FAVN (табл. 3, рис. 1–3). Результаты исследования показали, что сыворотки крови, отобранные до вакцинации, не содержали антител против вируса бешенства.

Из приведенных в таблице 3 данных следует, что инактивированные антирабические вакцины из штамма «ВНИИЗЖ» на 21 сут стимулировали выработку высокого уровня антител у привитых животных. После иммунизации сорбированной вакциной титры ВНА против вируса бешенства у 30% КРС составили 2,0–2,6 МЕ/см<sup>3</sup>, у 30% – 3,4 МЕ/см<sup>3</sup>, и у 40% – 4,5–5,9 МЕ/см<sup>3</sup>. После введения эмульсионной вакцины на основе адъюванта Montanide ISA 206 у 30% животных титры антирабических антител были равны 4,5–7,8 МЕ/см<sup>3</sup>, еще у 30% – 13,5–15,9 МЕ/см<sup>3</sup>, у остальных 40% – 17,8–23,4 МЕ/см<sup>3</sup>. Иммунизация вакцинным препаратом на основе адъюванта Montanide ISA 70 индуцировала у 20% животных выработку ВНА с титрами 10,3–13,5 МЕ/см<sup>3</sup>, у 30% – 15,9–17,8 МЕ/см<sup>3</sup> и у 50% КРС – 23,4–30,8 МЕ/см<sup>3</sup>. Средние значения титра антирабических антител составили 4,02 ± 0,76; 16,30 ± 2,03; 20,73 ± 3,39 МЕ/см<sup>3</sup> для вакцин № 1, 2, 3 соответственно. Следовательно, все экспериментальные антирабические вакцины, изготовленные из штамма «ВНИИЗЖ», стимулируют у КРС формирование поствакцинального иммунитета уже на 21 сут после инокуляции.

При проведении сравнительного анализа полученных результатов следует отметить, что эмульсионные антирабические вакцины вызывали формирование более напряженного иммунитета по сравнению с использованием сорбированного препарата. Так, среднее значение титра ВНА во 2-й группе животных было в 4,05 раза выше, а в 3-й группе в 5,16 раза выше, чем в 1-й группе КРС, привитого сорбированной вакциной.

Сравнивая средние значения титров антирабических антител у КРС, иммунизированных двумя представленными эмульсионными вакцинами на основе ISA 70 и ISA 206, выявили, что различие между ними менее значительное, чем с сорбированной, и составляет 4,43 МЕ/см<sup>3</sup>, или 1,27 раза в пользу препарата на основе ISA 70, что можно объяснить особенностями взаимодействия антигена вируса бешенства с выбранными адъювантами.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведены исследования по изучению иммунобиологических свойств трех инактивированных антирабических вакцин из штамма «ВНИИЗЖ», изготовленных с применением разных адъювантов: ГОА, Montanide ISA 206 и ISA 70. Выявлено, что полученные антирабические вакцины являются авирулентными и безвредными при тестировании на белых мышах и КРС.

Проведена оценка поствакцинального иммунитета КРС после введения предложенных инактивированных антирабических вакцин. Выявлено, что на 21 сут после введения препаратов, полученных с применением адъювантов ГОА, Montanide ISA 206 и ISA 70, средние значения титров ВНА составили 4,02; 16,30; 20,73 МЕ/см<sup>3</sup> соответственно.

Экспериментальные антирабические эмульсионные вакцины индуцируют выработку более высокого уровня ВНА у КРС по сравнению с сорбированной вакциной. Среднее значение титра ВНА в группе животных, которых иммунизировали эмульсионной вакциной на основе адъюванта Montanide ISA 206, было в 4,05 раза

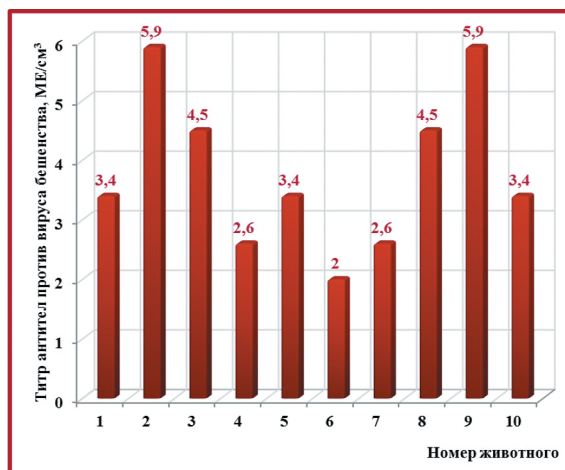


Рис. 1. Поствакцинальный иммунитет у КРС на 21 сут после введения инактивированной сорбированной антирабической вакцины (по данным реакции нейтрализации FAVN)

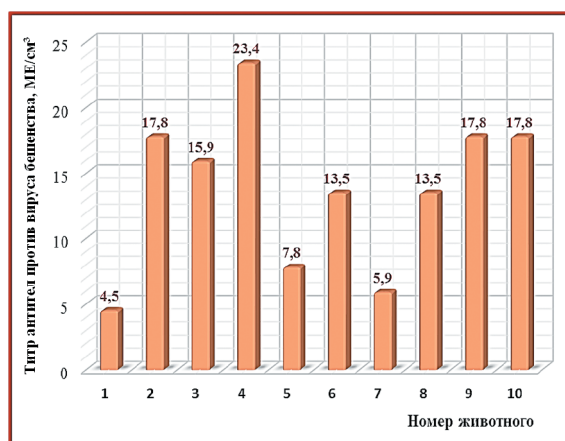


Рис. 2. Поствакцинальный иммунитет у КРС на 21 сут после введения инактивированной эмульсионной антирабической вакцины с использованием адъюванта Montanide ISA 206 (по данным реакции нейтрализации FAVN)

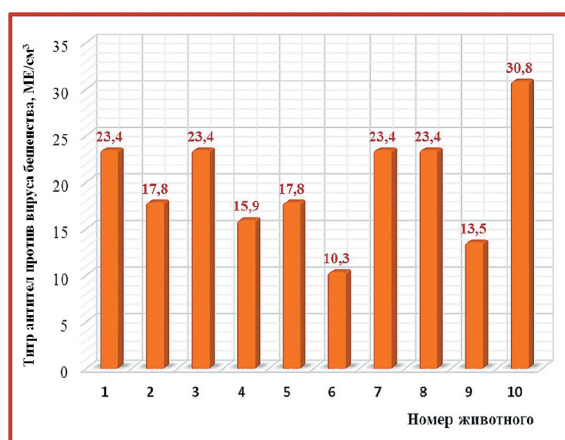


Рис. 3. Поствакцинальный иммунитет у КРС на 21 сут после введения инактивированной эмульсионной антирабической вакцины с использованием адъюванта Montanide ISA 70 (по данным реакции нейтрализации FAVN)

выше, а в группе КРС, вакцинированного препаратом на основе адьюванта Montanide ISA 70, – в 5,16 раза выше по сравнению с животными, привитыми сорбированной вакциной. Эмульсионная вакцина на основе масляного адьюванта ISA 70 показала более высокие результаты по уровню ВНА, чем при использовании других экспериментальных вакцин.

Полученные результаты исследований подтвердили, что разработанные антирабические препараты для иммунизации КРС безопасны и эффективны.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адьюванты: монография / А. Я. Самуйленко, С. А. Гринь, В. И. Еремец [и др.]; под ред. А. Я. Самуйленко. – М.: ВНИТИБП, 2016. – 168 с.
2. Анализ иммуногенности вакцин, применяемых для профилактики бешенства животных на территории Российской Федерации / Е. В. Чернышова, Н. А. Назаров, А. Е. Метлин [и др.] // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2010. – Т. 8. – С. 64–73.
3. Анализ эффективности оральной вакцинации против бешенства в дикой среде на примере некоторых регионов Российской Федерации / А. Ю. Сухарьков, Н. А. Назаров, А. Е. Метлин [и др.] // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2010. – Т. 8. – С. 57–63.
4. Борисов А. В. Разработка технологии изготовления вирусвакцин против бешенства диких плотоядных: автореф. дис. ... канд. вет. наук. – Владимир, 2003. – 23 с.
5. Гланц С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
6. Груздев К. Н., Метлин А. Е. Бешенство животных. – Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2019. – 394 с.
7. Изучение колострального иммунитета у потомства енотовидных собак, иммунизированных оральной антирабической вирусвакциной «Синраб» / А. В. Борисов, И. А. Домский, В. В. Михалишин, А. Н. Балашов // Ветеринария и кормление. – 2013. – № 5. – С. 6–8.
8. Михалишин В. В., Мамков Н. С. Адьюванты и их использование // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2008. – Т. 6. – С. 340–371.
9. Недосеков В. В. Современные вакцины против бешенства животных // Ветеринария. – 2003. – № 8. – С. 23–25.
10. Оральная вакцинация диких плотоядных животных против бешенства / А. Е. Метлин, С. С. Рыбаков, В. В. Михалишин, Т. Н. Мюллер // Ветеринария. – 2009. – № 8. – С. 18–25.
11. Оценка поедаемости оральных антирабических вакцин / А. Ю. Сухарьков, Е. Ю. Чернышова, А. Е. Метлин [и др.] // Ветеринария. – 2011. – № 11. – С. 31–34.
12. Чернышова Е. В., Назаров Н. А., Метлин А. Е. Методические указания по определению вируснейтрализующих антител к вирусу бешенства в сыворотках крови животных в реакции нейтрализации в культуре клеток ВНК-21 (FAVN) // Методические указания по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных с использованием серологических реакций / ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»). – Владимир, 2015. – С. 207–216.
13. Эпизоотическая обстановка по бешенству на территории России в октябре 2018 года / Россельхознадзор. – URL: <https://www.fsvps.ru/fsvps/news/28513.html> (дата обращения: 30.10.18).
14. Эпизоотическая ситуация в Российской Федерации, 2017 год / сост.: О. Н. Петрова, А. К. Караулов, Н. С. Бардина [и др.]. – Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2018. – URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/rf/2017/iac2017.pdf> (дата обращения: 01.11.18).
15. Aubert M. F. A. Methods for the calculation of titres // *Laboratory Techniques in Rabies* / ed. F. X. Meslin, M. Kaplan, H. Koprowski. – 4th ed. – Geneva: WHO, 1996. – P. 445–459.
16. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). – URL: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>.
17. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees) / OIE. – 8th ed. – Paris, 2018. – Vol. 1, Chap. 3.1.17. – P. 578–612. – URL: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.01.17\\_RABIES.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.17_RABIES.pdf).

## REFERENCES

1. Adjuvants: monograph [Ad'yuvanty: monografiya]. A. Ya. Samuylenko, S. A. Grin, V. I. Yemetz [et al.]; ed. by A. Ya. Samuylenko. M.: VNITIBP, 2016 (in Russian).
2. Immunogenicity analysis of the vaccine used for rabies prevention in the territory of the Russian Federation [Analiz immunogennosti vaktsin, primenyaemykh dlya profilaktiki beshenstva zhivotnykh na territorii Rossijskoj Federacii]. Ye. V. Chernyshova, N. A. Nazarov, A. Ye. Metlin [et al.]. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2010; 8: 64–73 (in Russian).
3. Analysis of the efficacy of oral rabies vaccination in wild nature based on the example of some regions in the Russian Federation [Analiz effektivnosti oral'noj vaktsinacii protiv beshenstva v dikoj srede na primere nekotorykh regionov Rossijskoj Federacii]. A. Yu. Sukharkov, N. A. Nazarov, A. Ye. Metlin [et al.]. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2010; 8: 57–63 (in Russian).
4. Borisov A. V. Development of production technology for rabies vaccines in wild carnivores [Razrabotka tekhnologii izgotovleniya virusvaktsin protiv beshenstva dikih plotoyadnykh]: author's abstract. ... candidate of veterinary science. Vladimir, 2003 (in Russian).
5. Glantz S. Medical and biological statistics [Mediko-biologicheskaya statistika]: translated from English. M.: Praktika, 1999 (in Russian).
6. Gruzdev K. N., Metlin A. Ye. Animal rabies [Beshenstvo zhivotnykh]. Vladimir: FGBI "ARRIAH", 2019 (in Russian).
7. Study of colostral immunity in the offspring of raccoon dogs immunized with the "Sinrab" oral rabies virus vaccine [Izuchenie kolostalnogo immuniteta u potomstva enotovidnykh sobak, immunizirovannykh oral'noj antirabicheskoy virusvaktsinoj "Sinrab"]. A. V. Borisov, I. A. Domskey, V. V. Mikhailishin, A. N. Balashov. *Veterinaria i kormlenie*. 2013; 5: 6–8 (in Russian).
8. Mikhailishin V. V., Mamkov N. S. Adjuvants and their use [Ad'yuvanty i ih ispol'zovanie]. *Proceedings of the Federal Center for Animal Health*. 2008; 6: 340–371 (in Russian).
9. Nedosekov V. V. Modern vaccines against animal rabies [Sovremennye vaktsiny protiv beshenstva zhivotnykh]. *Veterinariya*. 2003; 8: 23–25 (in Russian).
10. Oral vaccination of wild carnivores against rabies [Oral'naya vaktsinaciya dikih plotoyadnykh zhivotnykh protiv beshenstva]. A. Ye. Metlin, S. S. Rybakov, V. V. Mikhailishin, T. N. Muller. *Veterinariya*. 2009; 8: 18–25 (in Russian).
11. Evaluation of palatability of oral rabies vaccines [Ocenka poedae-mosti oral'nykh antirabicheskikh vaktsin]. A. Yu. Sukharkov, E. Yu. Chernyshova, A. Ye. Metlin [et al.]. *Veterinariya*. 2011; 11: 31–34 (in Russian).
12. Chernyshova Ye. V., Nazarov N. A., Metlin A. Ye. Methodical guidelines for determination of virus-neutralizing antibodies against rabies virus in animal sera using neutralization test in BHK-21 cell culture (FAVN) [Metodicheskie ukazaniya po opredeleniyu virusneitralizuyushchikh antitel k virusu beshenstva v syvorotkakh krovi zhivotnykh v reakcii nejtralizacii v kul'ture kletok VNK-21 (FAVN)]. *Methodical guidelines for diagnosis of livestock diseases using serological tests [Metodicheskie ukazaniya po diagnostike zabozelevanij sel'skhozajstvennykh zhivotnykh s ispol'zovaniem serologicheskikh reakcij]*. FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"). Vladimir, 2015; 207–216 (in Russian).
13. Rabies epidemic situation in the Russian Federation in October 2018 [Epizooticheskaya obstanovka po beshenstvu na territorii Rossii v oktyabre 2018 goda]. Rosselkhoz nadzor. URL: <https://www.fsvps.ru/fsvps/news/28513.html> (date of reference: 30.10.18) (in Russian).
14. Rabies epidemic situation in the Russian Federation in 2017 [Epizooticheskaya situatsiya v Rossijskoj Federacii, 2017 god]. compiler: O. N. Petrova, A. K. Karaulov, N. S. Bardina [et al.]. Vladimir: FGBI "ARRIAH", 2018. URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/rf/2017/iac2017.pdf> (date of access: 01.11.18) (in Russian).
15. Aubert M. F. A. Methods for the calculation of titres. *Laboratory Techniques in Rabies*. ed. F. X. Meslin, M. Kaplan, H. Koprowski. 4th ed. Geneva: WHO, 1996; 445–459.
16. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). URL: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>.
17. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees). OIE. 8th ed. Paris, 2018; 1, Chap. 3.1.17: 578–612. URL: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.01.17\\_RABIES.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.17_RABIES.pdf).

Поступила 21.09.19

Принята в печать 19.11.19

# МЕТОД ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ: ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Н. А. Кирсанова<sup>1</sup>, А. В. Сухоедова<sup>2</sup>, М. А. Плескачева<sup>3</sup>, И. В. Солтынская<sup>4</sup>, И. А. Тимофеева<sup>5</sup>, О. В. Прасолова<sup>6</sup>, Е. В. Крылова<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Научный сотрудник, ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия, e-mail: n.kirsanova@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0002-1666-3058

<sup>2</sup> Младший научный сотрудник, ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия, e-mail: a.suhoedova@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0002-7552-4816

<sup>3</sup> Лаборант-исследователь, ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия, e-mail: pleskacheva@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0002-6721-2812

<sup>4</sup> И.о. заведующего отделом, ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия, e-mail: i.soltynskaya@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0002-6274-5265

<sup>5</sup> Научный сотрудник, ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия, e-mail: i.timofeeva@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0002-6996-1817

<sup>6</sup> Старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия, e-mail: o.prasolova@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0001-8924-2273

<sup>7</sup> Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия, e-mail: e.krylova@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0003-0080-0158

## РЕЗЮМЕ

В настоящее время зарегистрировано большое количество различных групп заболеваний сельскохозяйственных животных, в которых наследственность играет значимую роль. Например, у крупного рогатого скота выявлено свыше 500 генетически обусловленных морфологических и функциональных нарушений, причем для 150 известны конкретные мутации. Реализация генетического материала крупного рогатого скота сопровождается распространением различных заболеваний, обусловленных мутациями, возникающими у выдающихся представителей пород. В результате насыщения популяций летальными мутациями возникла необходимость более широкого использования молекулярно-генетических методов для выявления моногенных наследственных заболеваний. Для решения данной задачи перспективно применение технологий пиросеквенирования ДНК, наиболее удобной для экспресс-диагностики однонуклеотидных мутаций в геноме крупного рогатого скота, расположенных в областях с известной нуклеотидной последовательностью. С использованием пиросеквенирования в ФГБУ «ВГНКИ» были разработаны, валидированы и утверждены методики идентификации наиболее распространенных значимых мутаций крупного рогатого скота голштинской,

симментальской, бурой швицкой и абердин-ангусской пород, ассоциированных с дефицитом адгезии лейкоцитов, комплексным пороком позвоночника, дефицитом уридин-монофосфат синтетазы, цитруллинемией, спинальной мышечной атрофией, спинальной демиелинизацией, гаплотипом 2 бурой швицкой породы, синдромом Вивера, с дупликацией развития, α-маннозидозом, карликовостью, субфертильностью быков, тромбоцитопатией, синдромом арахномелии, дефицит-цинк-подобным синдромом. Данные методики предназначены для исследования спермопродукции в племенных центрах страны, научных лабораториях, работающих в области биотехнологии и репродукции животных, центрах воспроизводства продуктивных животных. Внедрение предложенных генетических тестов для исследования на наличие мутантных аллелей и ограничение использования носителей мутаций в племенной работе позволит минимизировать распространение наследственных заболеваний и тем самым улучшить отечественный генофонд крупного рогатого скота.

**Ключевые слова:** пиросеквенирование, наследственные заболевания, генетические аномалии, полиморфизм, крупный рогатый скот.

# PYROSEQUENCING: ITS POTENTIAL AND LIMITATIONS IN DIAGNOSIS OF INHERITED DISEASES IN CATTLE

N. A. Kirsanova<sup>1</sup>, A. V. Sukhoedova<sup>2</sup>, M. A. Pleskacheva<sup>3</sup>, I. V. Soltynskaya<sup>4</sup>, I. A. Timofeeva<sup>5</sup>, O. V. Prasolova<sup>6</sup>, E. V. Krylova<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Researcher, FGBU "VGNKI", Moscow, Russian Federation, e-mail: n.kirsanova@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0002-1666-3058

<sup>2</sup> Junior Researcher, FGBU "VGNKI", Moscow, Russian Federation, e-mail: a.suhoedova@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0002-7552-4816

<sup>3</sup> Laboratory Research Assistant, FGBU "VGNKI", Moscow, Russian Federation, e-mail: pleskacheva@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0002-6721-2812

<sup>4</sup> Interim Head of Department, FGBU "VGNKI", Moscow, Russian Federation, e-mail: i.soltynskaya@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0002-6274-5265

<sup>5</sup> Researcher, FGBU "VGNKI", Moscow, Russian Federation, e-mail: i.timofeeva@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0002-6996-1817

<sup>6</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBU "VGNKI", Moscow, Russian Federation, e-mail: o.prasolova@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0001-8924-2273

<sup>7</sup> Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBU "VGNKI", Moscow, Russian Federation, e-mail: e.krylova@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0003-0080-0158

## SUMMARY

A large number of different groups of livestock diseases in which heredity plays a significant role are currently reported. In particular, more than 500 genetically determined morphological and functional disorders have been detected in cattle; for 150 of them, specific mutations are known. The sale of bovine genetic materials is associated with the spread of various diseases caused by mutations that occur in the prominent representatives of breeds. The abundance of lethal mutations in the populations requires a broader application of molecular diagnostic methods for detection of monogenic hereditary diseases. DNA pyrosequencing, being the most convenient technique for the rapid diagnosis of single nucleotide mutations in the bovine genome that are located in the regions with known nucleotide sequence, has a potential for meeting this need. Pyrosequencing-based methods for identification of the most common significant mutations in Holstein, Simmental, Brown Swiss and Aberdeen Angus cattle were developed, validated and

approved at the FGBU "VGNKI". Such mutations are associated with leukocyte adhesion deficiency, complex vertebral malformation, uridine monophosphate synthetase deficiency, citrullinemia, spinal muscular atrophy, spinal cord demyelination, Brown Swiss haplotype 2, Weaver syndrome, developmental duplications, α-mannosidosis, dwarfism, bovine male subfertility, thrombocytopathy, arachnomelia syndrome, hypozincemia-like syndrome. These methods are intended to test semen in the breeding centres, scientific laboratories working in the field of biotechnology and animal reproduction, livestock reproduction centres. The use of the proposed genetic tests to detect mutant alleles, as well as reduced use of mutation-bearing animals in stock breeding will allow minimizing the occurrence of inherited diseases and thus improving the gene pool of cattle in the country.

**Key words:** pyrosequencing, inherited diseases, genetic abnormalities, polymorphism, cattle.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время интенсивное использование мирового генофонда и биотехнологий репродукции (искусственное осеменение, трансплантация эмбрионов) позволили значительно повысить генетический потенциал продуктивности животных за счет получения потомства производителей – лидеров породы. Однако при таком интенсивном потоке селекции по желаемым продуктивным признакам в породах крупного рогатого скота (КРС) стали накапливаться мутации, связанные с разнообразными патологиями [3, 6]. При этом снижаются воспроизводительная способность и плодовитость, жизнеспособность новорожденных и молодняка, продолжительность хозяйственного использования животных, что влечет за собой значительный экономический ущерб. Поэтому актуальной является разработка методик для своевременного выявления скрытых мутаций у животных-производителей и выбраковки спермодоз по наличию генетических аномалий. Выявление животных – носителей мутаций, ассоциированных с различными заболеваниями, возможно только с помощью молекулярно-генетических методов.

Моногенные наследственные заболевания, как правило, фенотипически могут быть выявлены только у рецессивных гомозиготных носителей на позднем постэмбриональном развитии или в раннем постнатальном периоде. Такие носители часто нежизнеспособны. У гетерозиготных носителей мутации фенотипически не проявляются. ДНК-тестирование ремонтного молодняка в раннем возрасте позволит выявить скрытых носителей и не допустить распространения наследственных заболеваний в популяциях КРС. Нежелательные аллели в популяции можно будет исключить за одно поколение и значительно ускорить процесс селекции.

У КРС выявлено свыше 500 генетически обусловленных морфологических и функциональных нарушений, причем для 150 известны конкретные мутации [9, 11]. Среди шести широко распространенных пород наибольшее число таких отклонений зафиксировано в голштинской породе, далее следуют фризская, чернопестрая, симментальская, швицкая и айрширская породы (соответственно 45, 32, 26, 24, 20 и 19 аномалий). Генетическая природа большей части наследственных заболеваний КРС связана с точечными мутациями, как правило, это однонуклеотидные замены (SNP) в определенных участках генов. Для выявления однонуклеотидных полиморфизмов генома используется широкий спектр молекулярно-биологических методов с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) [1]. К наиболее распространенным методам можно отнести анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, аллель-специфическую ПЦР, различные варианты ПЦР в режиме реального времени, гибридизацию с использованием ДНК-чипов, масс-спектрометрический анализ и методы секвенирования ДНК. Однако только секвенирование, являясь прямым методом определения нуклеотидной последовательности, позволяет однозначно интерпретировать полученный результат – нуклеотидную последовательность области полиморфизма и нуклеотидный полиморфизм в гомо- или гетерозиготном состоянии.

Выбор метода детекции генетического полиморфизма зависит как от задач, поставленных перед лабораторией, в т. ч. от планируемого количества исследований, так и от нуклеотидной последовательности анализируемой области генома. Поскольку для определения

однонуклеотидных полиморфизмов достаточно провести секвенирование небольшого фрагмента ДНК, использование секвенирования методом Сэнгера или высокопроизводительных систем генетического анализа не всегда целесообразно.

Для задач массового скрининга на наличие известных полиморфизмов, обуславливающих различные моногенные наследственные заболевания КРС, наиболее удобен метод пиросеквенирования. С его помощью возможно определение нуклеотидных последовательностей коротких фрагментов в области генетических полиморфизмов и выявление известных точечных мутаций (однонуклеотидные замены, делеции/вставки одного-трех нуклеотидов) путем сравнения с референсной последовательностью ДНК. С использованием технологии пиросеквенирования в ФГБУ «ВГНКИ» были разработаны методики идентификации наиболее распространенных значимых мутаций КРС голштинской, бурой швицкой, абердин-ангусской и симментальской пород.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования был использован биологический материал (замороженная сперма, венозная кровь) от быков голштинской, бурой швицкой, абердин-ангусской и симментальской пород как отечественной, так и зарубежной селекции.

Выделение ДНК из венозной крови осуществляли сорбционным методом с использованием набора «ДНК-сорб-С-М» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) согласно инструкции производителя. Выделение ДНК из замороженной спермы осуществляли с использованием набора «ДНК-сорб-С-М» с модификациями ФГБУ «ВГНКИ».

Дизайн праймеров для ПЦР и секвенирования проводили с использованием программного обеспечения PyroMark Assay Design Software. Для проведения ПЦР был использован ДНК-амплификатор «Терцик» («ДНК-Технология», Россия). Пиросеквенирование проводили на системе генетического анализа PyroMark Q96 MD (Qiagen, Германия) с использованием набора реагентов PyroMark Gold Q96 Reagents (50×96) производства Qiagen.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С использованием технологии пиросеквенирования были разработаны методики выявления мутаций, ассоциированных с наиболее распространенными моногенными наследственными заболеваниями КРС (табл. 1).

На первом этапе работы был проведен анализ нуклеотидных последовательностей генов-мишеней, представленных в базах данных OMIA, NCBI [10, 11] и литературных источниках [4, 7, 8]. Выбраны участки генома, ассоциированные с конкретными наследственными заболеваниями. С помощью программного обеспечения PyroMark Assay Design Software выбраны олигонуклеотидные праймеры, позволяющие амплифицировать соответствующие фрагменты генов в области мутации, а также праймеры для секвенирования.

В зависимости от нуклеотидной последовательности исследуемого фрагмента возможно проведение секвенирования в двух направлениях: прямой анализ (forward analysis) и обратный анализ (reverse analysis). В первом случае обратный праймер для амплификации должен быть связан на 5'-конце с биотином, во

Таблица 1

Характеристики мутаций, выявляемых с использованием технологии пиросеквенирования ДНК

| Порода            | Аббревиатура | Заболевание                         | Полиморфизм              | Ген     | Локализация  |
|-------------------|--------------|-------------------------------------|--------------------------|---------|--------------|
| голландская       | CVM          | комплексный порок позвоночника      | 538G>T                   | SLC35A3 | хромосома 3  |
|                   | BLAD         | дефицит адгезии лейкоцитов          | 383A>G                   | ITGB2   | хромосома 1  |
|                   | DUMPS        | дефицит уридин-монофосфат синтетазы | 1213C>T                  | UMPS    | хромосома 1  |
|                   | CIT          | цитруллинэмия                       | 256C>T                   | ASS     | хромосома 11 |
| бурая швицкая     | SMA          | спинальная мышечная атрофия         | 562G>A                   | KDSR    | хромосома 24 |
|                   | SDM          | спинальная демиелинизация           | 560G>A                   | SPAST   | хромосома 11 |
|                   | W            | синдром Вивера                      | 1703G>A                  | PNPLA8  | хромосома 4  |
|                   | BH2          | гаплотип 2 бурой швицкой            | 757T>C                   | TUBD1   | хромосома 19 |
| абердин-ангусская | DD           | дупликация развития                 | 932T>C                   | NHLRC2  | хромосома 26 |
|                   | MA           | $\alpha$ -маннозидоз                | 961T>C                   | MAN2B1  | хромосома 7  |
|                   | DW           | карликовость                        | 2032C>T                  | PRKG2   | хромосома 6  |
| симментальская    | BMS          | субфертильность быков               | 483C>A                   | TMEM95  | хромосома 19 |
|                   | TP           | тромбоцитопатия                     | 701A>G                   | RASGRP2 | хромосома 29 |
|                   | ZDL          | дефицит-цинк-подобный синдром       | 702G>A                   | PLD4    | хромосома 21 |
|                   | AS           | синдром арахноидии                  | 1224_1225delCA (делеция) | MOCS1   | хромосома 23 |

втором – с биотином должен быть связан прямой праймер (табл. 2).

Подготовка ПЦР-продукта к пиросеквенированию включает инкубацию ампликона с частицами сефарозы, покрытыми стрептавидином, щелочную денатурацию для получения одноцепочечной ДНК, серию последовательных отмывок с помощью вакуумно-фильтрационной системы, а также отжиг секвенирующего праймера в области анализируемого генетического локуса.

Секвенирование ПЦР-продукта проводят с использованием системы генетического анализа PyroMark Q96 MD. Реакция пиросеквенирования протекает в присутствии набора ферментов (ДНК-полимераза, люцифераза, АТФ-сульфуридаза, апираза), субстратов (люциферин, аденозин-5-фосфосульфат) и дезоксинуклеотидов.

При последовательном добавлении в реакционную смесь дезоксинуклеотида, в случае его комплементарности матрице, ДНК-полимераза катализирует включение нуклеотида в растущую цепь ДНК, что сопровождается высвобождением пирофосфата в количестве, эквивалентном количеству встроившихся нуклеотидов. АТФ-сульфуридаза в присутствии аденозин-5-фосфосульфата превращает пирофосфат в АТФ. Полученная АТФ запускает реакцию окисления люциферина в оксильюциферин, в результате чего происходит образование видимого света в количестве, пропорциональном количеству АТФ. Хемилюминесцентный сигнал детектируется и отображается в виде пиков на пинограмме. Высота каждого пика пропорциональна количеству нуклеотидов, включенных в матрицу. Добавление нуклеотидов в реакционную смесь осуществ-

Таблица 2

Способы проведения амплификации фрагментов, содержащих полиморфный генетический локус

| Заболевание | Размер ампликона, п. н. | Тип анализа      | Биотинилированный праймер |
|-------------|-------------------------|------------------|---------------------------|
| CVM         | 90                      | reverse analysis | прямой                    |
| BLAD        | 122                     | forward analysis | обратный                  |
| DUMPS       | 115                     | reverse analysis | прямой                    |
| CIT         | 146                     | forward analysis | обратный                  |
| SMA         | 140                     | forward analysis | обратный                  |
| SDM         | 97                      | reverse analysis | прямой                    |
| W           | 96                      | reverse analysis | прямой                    |
| BH2         | 86                      | forward analysis | обратный                  |
| DD          | 84                      | forward analysis | обратный                  |
| MA          | 103                     | forward analysis | обратный                  |
| DW          | 210                     | forward analysis | обратный                  |
| BMS         | 136                     | forward analysis | обратный                  |
| TP          | 170                     | reverse analysis | прямой                    |
| ZDL         | 183                     | reverse analysis | прямой                    |
| AS          | 105                     | reverse analysis | прямой                    |

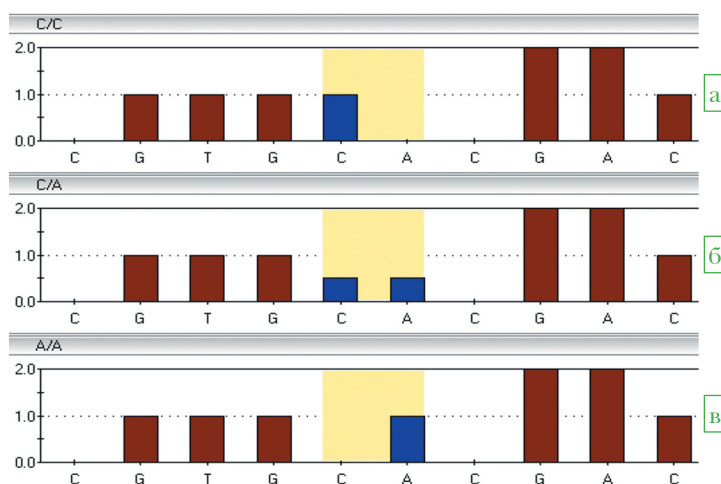


Рис. 1. Референсные пирограммы для идентификации мутации BMS (прямой анализ)

а – нормальный генотип;

б – гетерозигота (носитель);

в – гомозигота по мутантному аллелю.

вляется последовательно в соответствии с заданной нуклеотидной последовательностью [5]. На заключительной стадии пиросеквенирования проводится анализ полученных данных.

Поскольку объектом исследования являются охарактеризованные полиморфные локусы в геноме КРС и положение однонуклеотидной мутации известно, существует возможность для автоматической обработки результата программным обеспечением генетического анализатора PyroMark Q96 MD. На рисунке 1 представлены референсные пирограммы для каждого из вариантов анализируемого полиморфизма в гене TMEM95. Мутация в этом гене ассоциирована с субфертильностью быков симментальской породы (BMS).

Пример интерпретации результатов пиросеквенирования представлен на рисунке 2. Анализ области полиморфизма осуществляется автоматически программным обеспечением на основании относительных высот сигналов в полиморфной области (по отношению к сигналам, соответствующим референсным нуклеотидам). Достоверность прочтения пиков определяется программой SNP-RUN.

Для анализа аллельного состояния полиморфизмов используют только пирограммы надлежащего качества.

В данной работе были установлены следующие критерии оценки качества пирограмм:

1) анализируемая последовательность должна содержать установленное количество невариабельных референсных нуклеотидов. Анализируемая последовательность – это короткий фрагмент последовательности ДНК, содержащий один или несколько полиморфизмов, которые необходимо проанализировать. Референсные пики используются во время анализа для оценки высоты пиков в области полиморфизма и как внутренний контроль при оценке качества. Например, на рисунке 2 референсными являются нуклеотиды в позициях 2–4, 8–10;

2) отсутствие фонового сигнала в пустых позициях на пирограмме, автоматически созданных программой. Пустые позиции служат показателями неспецифического нуклеотидного встраивания. На рисунке 2 нуклеотиды в позициях 1 и 7 отсутствуют в целевой нуклеотидной последовательности, не встраиваются в синтезируемую цепь, соответственно уровень сигнала равен нулю;

3) отсутствие фонового сигнала в переменных позициях (область мутации, на рисунке 2 выделена цветом);

4) достаточная интенсивность сигнала целевых и референсных пиков, высота единичного пика должна составлять не менее 30 относительных световых единиц RLU (величина, используемая в пиросеквенировании для определения высоты пиков на пирограмме). На рисунке 2а указана высота пика в 281 RLU.

На основании относительной высоты целевых пиков в переменной позиции на пирограмме определяется генотип по исследуемому генетическому локусу и выдается заключение о генотипе животного. Варианты определяемого генотипа: гомозигота по частому аллелю (нормальный генотип), гетерозигота, гомозигота по редкому аллелю (мутантный генотип).

Например, при идентификации мутации BMS результат интерпретируется следующим образом (рис. 1):

– C/C – нормальный генотип (гомозигота по нормальному аллелю, мутация не выявлена);

– C/A – животное является носителем мутации в гене TMEM95, ассоциированной с субфертильностью быков (BMS) (гетерозигота, присутствуют одна мутантная и одна нормальная копии генов);

– A/A – мутантный генотип (гомозигота по мутантному аллелю).

С помощью разработанных методик на основе метода пиросеквенирования для мониторинга частоты

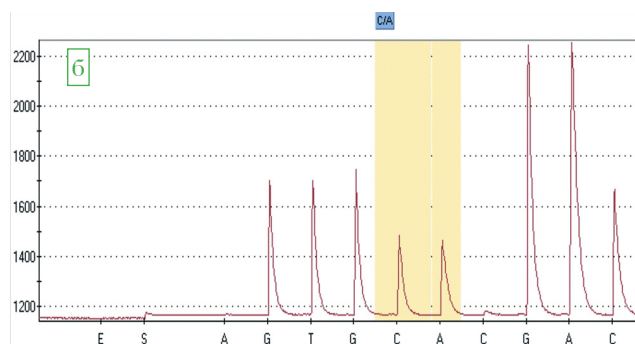
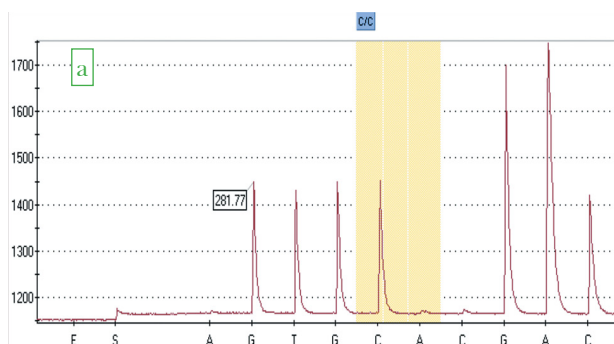


Рис. 2. Пирограммы, полученные при исследовании идентификации мутации BMS (прямой анализ)

а – нормальный генотип;

б – гетерозигота (носитель мутации)

встречаемости однонуклеотидных полиморфизмов выявили среди быков: голштинской породы – 2% носителей мутаций, ассоциированных с комплексным пороком позвоночника, и 0,5% носителей дефицита адгезии лейкоцитов; симментальской породы – 2% носителей синдрома арахноидии, 5% носителей субфертильности быков и 7% – тромбоцитопатии; абердин-ангусской породы – 7,5% носителей дупликации развития; бурой швицкой породы – 5% носителей спинальной мышечной атрофии.

Таким образом, метод пиросеквенирования обладает рядом преимуществ. Он эффективен для быстрого определения большого числа коротких последовательностей ДНК, выявления единичных мутаций нуклеотидов, ресеквенирования и т. д. Система генетического анализа PyroMark Q96 MD позволяет определить короткую последовательность ДНК до 96 образцов за небольшой промежуток времени. Простые химические реакции и надежная система детекции исключают необходимость использования в данном методе гелей, электрофореза и специфических флуоресцентных меток, что значительно упрощает пробоподготовку. При этом значительно снижается время и стоимость исследования в сравнении с капиллярным электрофорезом [2].

Кроме того, анализ полученных при пиросеквенировании данных прост и понятен. Он заключается в сравнении полученного на выходе графика с предложенной программным обеспечением референсной пирогаммой.

Перечисленные особенности делают метод пиросеквенирования наиболее удобным для экспресс-диагностики однонуклеотидных мутаций в геноме КРС, расположенных в областях с известной нуклеотидной последовательностью.

Однако следует отметить и недостатки метода. В связи с тем, что длина фрагментов ДНК для пиросеквенирования должна быть не более 200 п. н., данный метод не подходит для диагностики мутаций, обусловленных протяженными делециями или вставками. Поэтому для выявления носителей брахиспинального синдрома, остеопетроза и множественного артрогрипоза среди КРС голштинской и абердин-ангусской пород нами были разработаны методики на основе метода ПЦР с электрофоретической детекцией. Указанные заболевания обусловлены протяженными делециями (более 2000 п. н.).

Пиросеквенирование не позволяет точно определить в последовательности ДНК число одинаковых нуклеотидов при их количестве более 6 подряд. Так, например, мутация, ассоциированная с арахноидией и артрогрипозом у КРС бурой швицкой породы (SAA), представляет собой инсерцию одного нуклеотида гуанина (с.363–364insG) в определенном положении гена SOUX после последовательности из 7 нуклеотидов гуанина [GGGGGGG]. Поэтому для определения такого однонуклеотидного полиморфизма необходимо провести секвенирование фрагмента ДНК в области мутации методом Сэнгера.

Следует отметить, что использование пиросеквенирования для определения точечных мутаций зависит от состава нуклеотидной последовательности в области полиморфизма. Возникают ситуации, когда определить генотип по исследуемому генетическому локусу (нормальный генотип или носитель) не пред-

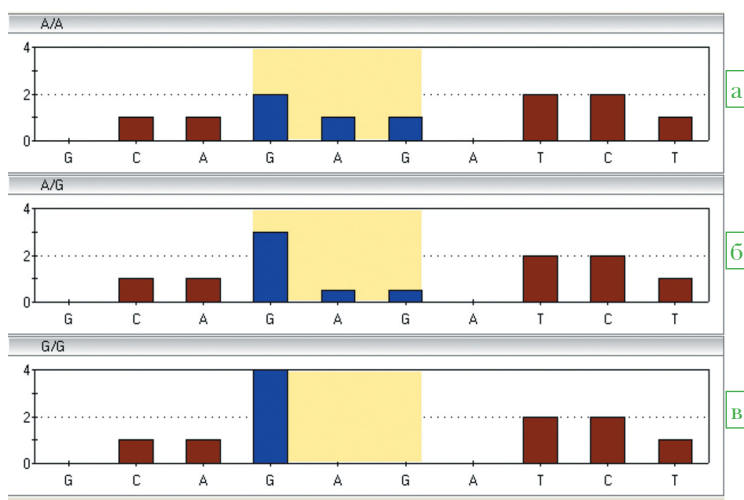


Рис. 3. Референсные пирогаммы для идентификации мутации TP (прямой анализ)

а – нормальный генотип;

б – гетерозигота (носитель);

в – гомозигота по мутантному аллелю.



Рис. 4. Референсные пирогаммы для идентификации мутации TP (обратный анализ)

а – нормальный генотип;

б – гетерозигота (носитель);

в – гомозигота по мутантному аллелю.

ставляется возможным. Так, например, на рисунке 3 представлены референсные пирогаммы для идентификации тромбоцитопатии (TP) у КРС симментальской породы. Заболевание развивается при замене аденина на гуанин в 701-м положении гена RASGRP2 в 29-й хромосоме. При использовании прямого анализа корректно определить варианты полиморфизма (рис. 3а и 3б) на основании относительной высоты целевых пиков в переменной позиции весьма проблематично.

В данном случае для упрощения интерпретации результатов было изменено направление секвенирования. При использовании обратного анализа установить варианты полиморфизма не вызывает затруднений (рис. 4).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема контроля генетических дефектов у крупного рогатого скота в условиях глобализации и коммерциализации племенного дела стала важной частью отечественной профилактической ветеринарии и корректирующей селекции. Дальнейшее повышение генетического потенциала животных в стране может быть обеспечено, например, введением обязательных проверок быков-производителей на соответствующие породе моногенные наследственные заболевания и записью в племенные каталоги носителей данной мутации.

Метод пиросеквенирования дает возможность проводить массовый скрининг на наличие известных полиморфизмов, приводящих к различным моногенным наследственным заболеваниям у КРС. Он позволяет определять нуклеотидные последовательности коротких фрагментов в области генетических полиморфизмов и выявлять известные точечные мутации. Внедрение предложенных ФГБУ «ВГНКИ» генетических тестов с использованием технологии пиросеквенирования для идентификации мутаций КРС голштинской, бурой швицкой, абердин-ангусской и симментальской пород, ассоциированных с наиболее распространенными наследственными заболеваниями, увеличение числа диагностических центров для такого рода деятельности, информирование фермеров о проблеме и возможности ее решения позволит минимизировать распространение наследственных заболеваний и тем самым улучшить отечественный генофонд крупного рогатого скота.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Введение в молекулярную диагностику: учебно-методическое пособие: в 2 т. Т. 2: Молекулярно-генетические методы в диагностике наследственных и онкологических заболеваний / под. ред. М. А. Пальцева, Д. В. Залетаева. – М.: Медицина, 2011. – 503 с.
2. Генетические полиморфизмы и риск развития некоторых мультифакторных заболеваний / Е. С. Потехина, К. О. Миронов, О. П. Дрибноходова [и др.] // Справочник заведующего КДЛ. – 2014. – № 10. – С. 37–47.
3. Жигачев А. И., Эрнст Л. К., Кудрявцев В. А. Генетические болезни у черно-пестрого, голштинского и айширского скота и их профилактика // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2008. – № 1. – С. 46–56.
4. Моногенные наследственные дефекты и их роль в воспроизводстве / Н. Зиновьева, Н. Стрекозов, Г. Ескин [и др.] // Животноводство России. – 2015. – № 6. – С. 30–31.
5. Опыт использования систем генетического анализа на основе технологии пиросеквенирования / К. О. Миронов, Е. А. Дунаева, О. П. Дрибноходова, Г. А. Шипулин // Справочник заведующего КДЛ. – 2016. – № 5. – С. 33–43.
6. Основные генетические причины эмбриональных потерь в молочном скотоводстве, связанные с интенсивной селекцией по продук-

тивности / С. В. Гуськова, И. С. Турбина, Г. В. Ескин, Н. А. Комбарова // Молочное и мясное скотоводство. – 2014. – № 3. – С. 10–14.

7. Cole J. B., Null D. J., VanRaden P. M. Phenotypic and genetic effects of recessive haplotypes on yield, longevity, and fertility // *J. Dairy Sci.* – 2016. – Vol. 99 (9). – P. 7274–7288; DOI: 10.3168/jds.2015-10777.

8. Genetic disorders in beef cattle: a review / A. Cieplach, K. Rutkowska, J. Oprządek, E. Polawska // *Genes Genom.* – 2017. – Vol. 39 (5). – P. 461–471; DOI: 10.1007/s13258-017-0525-8.

9. Mendelian Inheritance in Cattle 2000 / ed. P. Millar, J. J. Lauvergne, C. Dolling Wasenigen: EAAP publication, 2000. – No. 101. – 590 p.

10. National Center for Biotechnology Information (NCBI). URL: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (дата обращения: 13.09.19).

11. Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA). URL: [www.omia.org/home](http://www.omia.org/home) (дата обращения: 13.09.19).

## REFERENCES

1. Introduction to molecular diagnostics: a study guide: in 2 volumes. Vol. 2: Molecular genetics methods in the diagnosis of inherited and oncology diseases [Vvedenie v molekulyarnuyu diagnostiku: uchebno-metodicheskoe posobie: v 2 t. T. 2: Molekulyarno-geneticheskie metody v diagnostike nasledstvennyh i onkologicheskikh zabolevanij]. Ed. by M. A. Paltsev, D. V. Zaletaev. M.: Meditsina, 2011 (in Russian).
2. Genetic polymorphisms and risk of developing certain multifactor diseases [Geneticheskie polimorfizmy i risk razvitiya nekotorykh mul'tifaktornykh zabolevanij]. E. S. Potekhina, K. O. Mironov, O. P. Dribnokhodova [et al.]. *Spravochnik zaveduyushchego KDL*. 2014; 10: 37–47 (in Russian).
3. Zhigachev A. I., Ernst L. K., Kudryavtsev V. A. Genetic diseases in Black-and-White, Holstein and Ayrshire cattle and prevention thereof [Geneticheskie bolezni u cherno-pestrogo, golshtinskogo i ajshirskogo skota i ih profilaktika]. *Issues of Legal Regulation in Veterinary Medicine*. 2008; 1: 46–56 (in Russian).
4. Monogenic hereditary defects and their role in reproduction [Monogennye nasledstvennye defekty i ih rol' v vosproizvodstve]. N. Zinovyeva, N. Strekozov, G. Eskin [et al.]. *Zhivotnovodstvo Rossii*. 2015; 6: 30–31 (in Russian).
5. Experience of using pyrosequencing-based genetic analysis systems [Opyt ispol'zovaniya sistem geneticheskogo analiza na osnove tekhnologii pirosekvenirovaniya]. K. O. Mironov, E. A. Dunaeva, O. P. Dribnokhodova, G. A. Shipulin. *Spravochnik zaveduyushchego KDL*. 2016; 5: 33–43 (in Russian).
6. Main genetic causes of embryonic loss in dairy cattle husbandry associated with intensive selection based on performance [Osnovnye geneticheskie prichiny embrional'nykh poter' v molochnom skotovodstve, svyazannye s intensivnoy selekciej po produktivnosti]. S. V. Guskova, I. S. Turbina, G. V. Eskin, N. A. Kombarova. *Dairy and Beef Cattle Farming*. 2014; 3: 10–14 (in Russian).
7. Cole J. B., Null D. J., VanRaden P. M. Phenotypic and genetic effects of recessive haplotypes on yield, longevity, and fertility. *J. Dairy Sci.* 2016; 99 (9): 7274–7288; DOI: 10.3168/jds.2015-10777.
8. Genetic disorders in beef cattle: a review. A. Cieplach, K. Rutkowska, J. Oprządek, E. Polawska. *Genes Genom.* 2017; 39 (5): 461–471; DOI: 10.1007/s13258-017-0525-8.
9. Mendelian Inheritance in Cattle 2000. ed. P. Millar, J. J. Lauvergne, C. Dolling Wasenigen: EAAP publication, 2000: 101.
10. National Center for Biotechnology Information (NCBI). URL: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (date of access: 13.09.19).
11. Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA). URL: [www.omia.org/home](http://www.omia.org/home) (date of access: 13.09.19).

Поступила 26.09.19

Принята в печать 25.12.19

## АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИЗОЛЯТА ВИРУСА ГРИППА А/CHICKEN/CHELYABINSK/30/2019 H9N2, ВЫДЕЛЕННОГО НА ТЕРРИТОРИИ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Н. Г. Зиняков<sup>1</sup>, О. С. Осипова<sup>2</sup>, П. Б. Акшалова<sup>3</sup>, В. Ю. Сосипаторова<sup>4</sup>, А. В. Андриясов<sup>5</sup>, Д. Б. Андрейчук<sup>6</sup>, И. А. Чвала<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: zinyakov@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-3015-5594

<sup>2</sup> Ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: osipova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-3176-157x

<sup>3</sup> Аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: akshalova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0003-1520-1887

<sup>4</sup> Младший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: sosipatorova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-9376-4728

<sup>5</sup> Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: andriyasov\_av@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-6314-2119

<sup>6</sup> Заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: andreychuk@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-1681-5795

<sup>7</sup> Заместитель директора по НИР и мониторингу, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: chvala@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-1659-3256

### РЕЗЮМЕ

В работе представлены данные по изучению генетических свойств изолята вируса гриппа A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2, выделенного в феврале 2019 г. из патологического материала (внутренних органов кур), поступившего из птицеводства Челябинской области. В результате вирусологических исследований определили подтип выделенного вируса – H9N2. При секвенировании участка гена гемагглютинина установлена аминокислотная последовательность сайта нарезания RSSR/GLF, характерная для низковирулентного вируса гриппа птиц. Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей фрагмента гена гемагглютинина (1–1539 п. н. открытой рамки считывания) показал принадлежность изолята A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 к генетической группе G1 низковирулентного вируса гриппа A/H9, представители которой широко распространены в странах Ближнего Востока и Средней Азии. Определена полная нуклеотидная последовательность генома исследуемого патогена. В результате сравнительного анализа всех геномных сегментов с использованием базы данных

GenBank установлено высокое родство (более 99%) вируса A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 с изолятами вируса гриппа A/H9, циркулировавшими на территории Израиля в 2006–2012 гг. Согласно анализу предсказанной аминокислотной последовательности изучаемого изолята выявлены позиции некоторых молекулярных маркеров, определяющие биологические свойства вируса. Большинство аминокислотных позиций гемагглютинина (по нумерации последовательности подтипа H3) предполагают сходство к ACA2-3Gal-рецепторам эпителиальных клеток птиц. Выявлены аминокислотные замены на участке рецептор-связывающего домена в сравнении с изолятами вируса гриппа A/H9N2, выделенными на территории России в 2018 г. Первичная структура генома изолята A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 имеет очень высокий уровень генетического сходства по всем генам с изолятом вируса гриппа A/chicken/Israel/215/2007 H9N2, использовавшимся в качестве вакцинного штамма.

**Ключевые слова:** грипп птиц, H9N2, генетический анализ, аминокислотные замены.

UDC 619:578.832.1:636.52/58:578.5

## ANALYSIS OF GENETIC CHARACTERISTICS OF INFLUENZA VIRUS A/CHICKEN/CHELYABINSK/30/2019 H9N2 ISOLATED IN CHELYABINSK OBLAST

N. G. Zinyakov<sup>1</sup>, O. S. Osipova<sup>2</sup>, P. B. Akshalova<sup>3</sup>, V. Yu. Sosipatorova<sup>4</sup>, A. V. Andriyasov<sup>5</sup>, D. B. Andreychuk<sup>6</sup>, I. A. Chvala<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: zinyakov@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-3015-5594

<sup>2</sup> Veterinarian, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: osipova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-3176-157x

<sup>3</sup> Post-Graduate Student, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: akshalova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0003-1520-1887

<sup>4</sup> Junior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: sosipatorova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-9376-4728

<sup>5</sup> Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: andriyasov\_av@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-6314-2119

<sup>6</sup> Head of Laboratory, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: andreychuk@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-1681-5795

<sup>7</sup> Deputy Director for Research and Monitoring, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: chvala@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-1659-3256

### SUMMARY

The paper presents data on the study of genetic characteristics of the influenza virus A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 isolated from pathological material (chicken internal organs) in February 2019 and received from the poultry farm in the Chelyabinsk Oblast. The H9N2 subtype of the isolated virus was identified based on virological analysis. Sequencing of the hemagglutinin gene segment revealed that the amino acid sequence at the cleavage site was RSSR/GLF, which is characteristic of a low virulent avian influenza virus. Phylogenetic analysis of the obtained nucleotide sequences of the hemagglutinin gene fragment (1–1539 bp open reading frame) showed that the A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 isolate belongs to the G1 genetic group of the low virulent influenza virus A/H9, the representatives of which are widely spread in the Middle Eastern and Central Asian countries. The complete nucleotide genome sequence of the studied pathogen was determined. The comparative analysis of all genomic segments using the GenBank

database revealed a close relationship (over 99%) between the A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 virus and the A/H9 influenza virus isolates circulating in Israel in 2006–2012. According to the analysis of the predicted amino acid sequence of the studied isolate, the positions of some molecular markers that determine the biological properties of the virus have been identified. Most amino acid positions of hemagglutinin (according to H3 subtype sequence numbering) suggest affinity for the ACA2-3Gal-receptors of avian epithelial cells. Amino acid substitutions were detected at the site within the receptor-binding domain as compared to the A/H9N2 influenza virus isolates obtained in Russia in 2018. The primary structure of the A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 isolate demonstrates a very high level of genetic similarity to the influenza virus isolate A/chicken/Israel/215/2007 H9N2 used as a vaccine strain.

**Key words:** avian influenza, H9N2, genetic analysis, amino acid substitutions.

## ВВЕДЕНИЕ

Вирус гриппа птиц (ВГП) относится к семейству *Orthomyxoviridae*, включающему согласно международной классификации International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) релиз Master Species List 2018b. v2 семь родов: *Alphainfluenzavirus* (A), *Betainfluenzavirus* (B), *Gammainfluenzavirus* (C), *Deltainfluenzavirus* (D), *Quarantavirus*, *Thogovirus*, *Isavirus*. Вирус гриппа типа А по строению поверхностных гликопротеинов классифицируют на 16 подтипов по гемагглютину и 9 подтипов по нейраминидазе [4, 11].

Вирусы гриппа, выделенные от птиц, по признаку вирулентности можно разделить на две обширные группы. Высоковирулентные вирусы, вызывающие острую генерализованную болезнь со смертностью в стаде до 100%, относятся к подтипам H5 и H7. Вирусы остальных подтипов, как правило, вызывают легкое, преимущественно респираторное или бессимптомное заболевание и классифицируются как низковирулентные [1]. Однако при нарушении условий содержания птиц и наличии ассоциированных заболеваний возможно развитие клинически выраженной болезни, приводящей к снижению продуктивности, санитарной выбраковке больных птиц из стада, повышенному отходу молодняка.

Вирусы подтипа H9N2 широко распространены в Китае, Юго-Восточной Азии, Пакистане, Южной Корее, Иране, Израиле, Индии, Африке как у дикой, так и у домашней птицы [2, 3, 5, 7–9, 12, 14]. Согласно литературным данным, вирусы подтипа H9 образуют несколько генетических групп: G1, Y280 и Y439 [1, 8, 10, 13]. Изоляты вируса гриппа из группы G1 являются эндемичными для стран Ближнего Востока и Средней Азии [8, 12]. В Российской Федерации грипп птиц подтипа H9N2 был выявлен в Амурской области в 2012 г., на Дальнем Востоке в Приморском крае в 2018 г., на территории Челябинской области в 2019 г. В последнее время вирусы гриппа птиц подтипа H9N2 широко распространены среди домашней птицы, представляют собой реальную угрозу для мировой птицеводческой отрасли и потенциальную опасность для человека [1].

Учитывая актуальные литературные данные [1, 2, 6], значительный интерес представляет изучение генетических свойств выделенного в 2019 г. на территории Челябинской области изолята A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2, что стало целью данного исследования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Вирусовыделение.** Проводили в 10-суточных свободных от патогенной микрофлоры эмбрионах кур (СПФ-КЭ). Из биологического материала готовили 10–20%-ю суспензию на фосфатно-буферном растворе (рН 7,2–7,4) и вводили ее в аллантоисную полость КЭ в объеме 0,2 см<sup>3</sup>. От эмбрионов, погибших через 24 ч инкубации и более, отбирали экстраэмбриональную жидкость (ЭЭЖ) с целью проведения последующих исследований.

**Выделение РНК.** Выделение суммарной РНК осуществляли с помощью набора «РИБО-сорб» (кат. № K2-1-Et-100) согласно инструкции производителя.

**Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ).** ОТ-ПЦР-РВ проводили в одну стадию с использованием набора OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, кат. № 210212) и 25 мМ раствора MgCl<sub>2</sub> (Promega, в наборе

с кат. № M8296) и систем праймеров на ген М и ген Н подтипа H9. Собирали смесь объемом 25 мкл: 9 мкл деионизованной воды, 5 мкл 5× буфера для ОТ-ПЦР, 1,25 мкл 25 мМ раствора MgCl<sub>2</sub>, 1 мкл раствора дНТФ 10 мМ, по 1 мкл раствора прямого и обратного праймеров с концентрацией 10 пмоль/мкл, 0,75 мкл раствора флуоресцентного зонда с концентрацией 10 пмоль/мкл, 1 мкл смеси ферментов обратной транскриптазы и полимеразы, 5 мкл раствора суммарной РНК. Обратную транскрипцию проводили 30 мин при 50 °С. Собственно для амплификации применяли следующие температурно-временные параметры: 95 °С – 10 мин (активация полимеразы), далее 40 циклов, каждый из которых состоит из трех шагов: 95 °С – 10 с, 50 °С – 35 с, 72 °С – 10 с.

**Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР).** Классическую ОТ-ПЦР проводили в одну стадию с использованием набора OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, кат. № 210212) и 25 мМ раствора MgCl<sub>2</sub> (Promega, в наборе с кат. № M8296) и системы праймеров на ген Н подтипа H9. Собирали смесь объемом 25 мкл, содержащую 9,75 мкл деионизованной воды, 5 мкл 5× буфера для ОТ-ПЦР, 1,25 мкл 25 мМ раствора MgCl<sub>2</sub>, 1 мкл раствора дНТФ 10 мМ, по 1 мкл раствора прямого и обратного праймеров с концентрацией 10 пмоль/мкл, 1 мкл смеси ферментов обратной транскриптазы и полимеразы, 5 мкл раствора суммарной РНК. Обратную транскрипцию проводили 30 мин при 50 °С. Собственно для амплификации применяли следующие температурно-временные параметры: 95 °С – 10 мин (активация полимеразы), далее 40 циклов, каждый из которых состоит из трех шагов: 95 °С – 50 с, 55 °С – 50 с, 72 °С – 60 с.

**Идентификация выделенного вируса.** Идентификацию вируса проводили в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с референтными сыворотками против ВГП подтипов H1–H16 (IZISVe, Италия) по HA и в реакции нейраминидазной активности (РТНА) с референтными сыворотками против ВГП подтипов N1–N9 (IZISVe, Италия) по NA. Реакции проводили согласно рекомендациям МЭБ и общепринятым методикам [4, 15, 16].

**Секвенирование.** Определение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена HA осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100 с использованием наборов BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя. Полногеномное секвенирование осуществляли с помощью генетического анализатора MySeq (Illumina) согласно инструкции производителя. Для приготовления библиотек использовали коммерческие наборы Nextera XT, Nextera XT Index Kit (Illumina).

**Нуклеотидные последовательности.** В работе использованы нуклеотидные последовательности изолятов и штаммов ВГП подтипа H9, опубликованные в базе данных GenBank электронного ресурса NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/)) и на платформе EpiFlu (<https://www.gisaid.org/>).

**Анализ нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей** проводили с помощью программы BioEdit версия 7.0.5.3. Выравнивание последовательностей проводили с помощью программы множественного выравнивания ClustalW. Построение филогенетического дерева осуществляли с помощью алгоритма NJ в реализации пакета MEGA версия 6.06.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В феврале 2019 г. в рамках выполнения программы государственного эпизоотологического мониторинга в референтной лаборатории вирусных болезней птиц (ФГБУ «ВНИИЗЖ») были проведены исследования 20 проб внутренних органов, полученных из птице-комплекса Челябинской области. Суспензии проб патологического материала инокулировали 10-суточным СПФ-КЭ. Гибели эмбрионов в течение 72 ч инкубации не отмечали. Гемагглютинирующая активность была обнаружена в 14 пробах ЭЭЖ, отобранных от зараженных СПФ-КЭ. Из остальных 6 проб биологического материала вирус в течение двух последовательных пассажей в СПФ-КЭ выделен не был.

Идентификация в РТГА со специфическими сыворотками H1–H16 и в РТНА с использованием референтных сывороток N1–N8 показала принадлежность выделенного инфекционного агента к подтипу H9N2.

В результате постановки ОТ-ПЦР-PB в полученных пробах был выявлен генетический материал вируса гриппа птиц типа А и идентифицирован подтип H9. ВГП подтипов H5, H7 в исследованных пробах не выявлен. Согласно результатам секвенирования фрагмента гена HA была подтверждена принадлежность изолятов к подтипу H9 (наличие сайта нарезания RSSR/GLF).

Для дальнейшего изучения был выбран изолят A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 с наивысшей гемагглютинирующей активностью (титр в реакции гемагглютинации составил 1:256).

В результате анализа нуклеотидной последовательности гена HA выделенного вируса A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 было установлено родство с группой изолятов, выявленных ранее на территории Израиля. Для филогенетического анализа был использован фрагмент нуклеотидной последовательности гена гемагглютинина (1–1539 п. н. открытой рамки считывания (ОРС)). В результате анализа было установлено, что выделенный вирус A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 относится к генетической группе G1 (рис. 1).

Дальнейшая характеристика вируса была основана на результатах ранее выполненной работы по структурированию вирусов подтипа H9N2, выделенных на территории Израиля [8]. Проведенный анализ показал, что вирус A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 входит в обширную группу, основу которой составляют изоляты вируса H9N2 клады IV. В данную клладу вошли вирусы, выделенные на территории Израиля, Иордании и Ливана в период с 2006 по 2012 г. [12]. Вирус A/chicken/Israel/215/2007 был взят для сравнения в качестве основного, как наиболее охарактеризованный ранее и использовавшийся в качестве вакцинного штамма [8].

Принимая во внимание, что вирусы низковирулентного гриппа в природе могут длительное время циркулировать среди дикой птицы, не вызывая эпизоотий, актуальным является полногеномное секвенирование подобных изолятов. Основной целью полногеномного секвенирования вирусов гриппа является глубокий анализ вирусного генома по разным параметрам, включая проверку возможного антигенного шифта у вновь выделенного вируса, наличие значимых аминокислотных замен в структуре вирусных протеинов, установление вероятных родительских форм и географического региона происхождения вируса.

Для сравнительного анализа были использованы доступные нуклеотидные последовательности, со-

державшие ОРС, ближайших его соседей по филогенетическому древу, выделенных в Израиле (A/chicken/Israel/215/2007), России (A/chicken/Siberia/03/2018, A/chicken/Amur\_Russia/17/2018), Египте (A/chicken/Egypt/D7099/2013), Ливане (A/quail/Lebanon/273/2010). Было установлено, что выделенный вирус A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 имеет очень высокий уровень генетической идентичности по всем генам с изолятом A/chicken/Israel/215/2007 H9N2 (табл.).

Высокий уровень генетического сходства по всем сегментам генома у изолятов A/chicken/Siberia/03/2018, A/chicken/Amur\_Russia/17/2018, A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 указывает на отсутствие реассортации с вирусами гриппа других подтипов, ранее обнаруженных на территории Российской Федерации.

Проведенный анализ аминокислотной последовательности белка HA изолята A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 показал наличие аминокислот  $G_{225}$   $LIG_{228}$  (по нумерации H3-подтипа) в рецептор-связывающей части вирусного протеина (рис. 2).

Для аминокислотной композиции  $G_{225}$   $LIG_{228}$  предполагается сродство к рецепторам птиц ACA2-3Gal и отсутствие взаимодействия с рецепторами млекопитающих группы ACA2-6Gal [17]. Таким образом, преимущественными носителями вируса A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 должны быть птицы. Однако существуют работы, показывающие, что замена Q226L

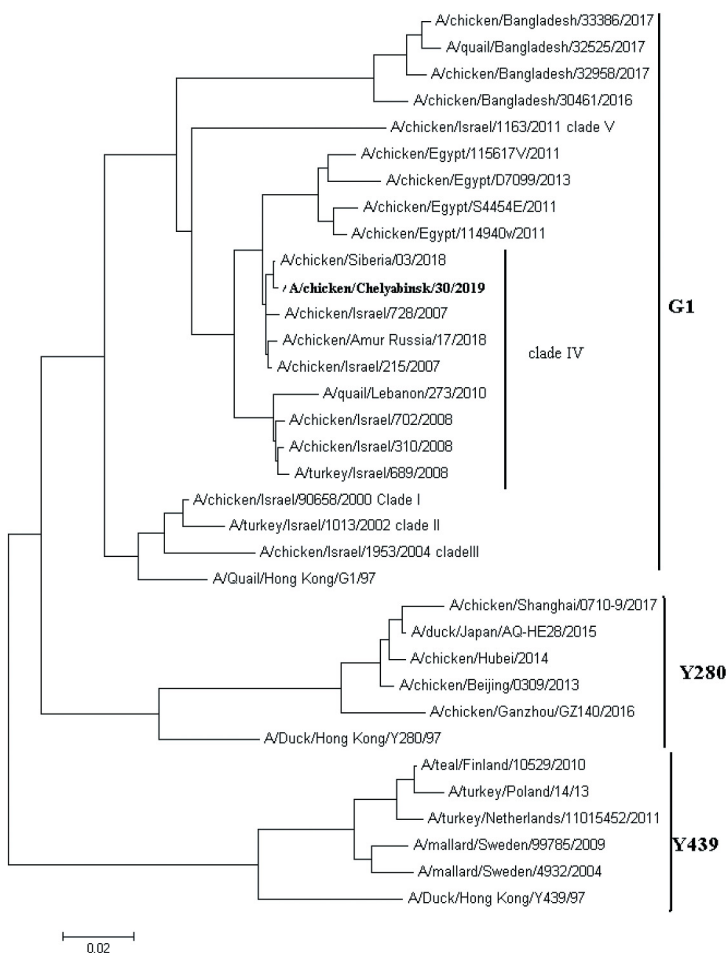


Рис. 1. Филогенетическое древо, построенное методом NJ по нуклеотидной последовательности фрагмента гена HA (1–1539 п. н. ОРС) вируса гриппа птиц подтипа H9

Таблица 1

Уровень генетической идентичности изолята A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 по разным генам

| Изолят ВГП подтипа H9N2       | Сравниваемый ген, % |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------------------------|---------------------|------|------|------|------|------|------|------|
|                               | HA                  | NA   | PB1  | PB2  | M    | NP   | PA   | NS   |
| A/chicken/Israel/215/2007     | 99,4                | 99,4 | 99,6 | 99,9 | 99,6 | 99,9 | 99,8 | 99,6 |
| A/chicken/Siberia/03/2018     | 99,8                | 99,7 | 99,8 | 99,8 | 99,6 | 99,9 | 99,8 | 99,7 |
| A/chicken/Amur_Russia/17/2018 | 99,3                | 99,5 | 99,7 | 99,7 | 99,6 | 99,7 | 99,8 | 99,5 |
| A/chicken/Egypt/D7099/2013    | 96,2                | 95,6 | 96,2 | 93,6 | 98,4 | 95,6 | 94,5 | 96,2 |
| A/quail/Lebanon/273/2010      | 96,5                | 97,8 | 90,9 | 88,2 | 91,4 | 90,5 | 92,1 | 83,0 |

способствует взаимодействию вируса гриппа с рецепторами клеток дыхательных путей человека [18].

Отдельно стоит отметить уже сформировавшуюся гетерогенность рецепторной части вирусного гемагглютинаина среди изолятов вируса гриппа птиц подтипа H9N2, выделенных на территории России. Анализ аминокислотной последовательности белка HA изолята A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 выявил аминокислотные замены на участке рецептор-связывающего домена позиции 160, 181, 226, 227 (по нумерации H3) (рис. 2).

Анализ предсказанной аминокислотной последовательности продемонстрировал высокое сходство (до 100%) вирусов A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 и ранее описанного A/chicken/Israel/215/2007 по остальным вирусным генам. Крайне малое число значимых нуклеотидных замен и отсутствие отличий по ключевым маркерам между изолятами A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 и A/chicken/Israel/215/2007 позволяет сделать вывод о сходных биологических свойствах сравниваемых вирусов.

Выявленное высокое генетическое сходство вируса A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 с ранее выявленными A/chicken/Siberia/03/2018 и A/chicken/Amur\_Russia/17/2018 позволяет предположить, что занос вируса на территорию Российской Федерации произошел из небольшого географического ареала. Для сравнения можно ознакомиться с доступной информацией по изолятам вируса гриппа подтипа H9N2, выделенным на территории Народной Республики Бангладеш [7]. Согласно приведенным данным, генетическая гетерогенность среди вирусов группы G1 из Бангладеш значительно больше. Так, по гену HA различие между изолятами 2016 и 2017 гг. достигает 3%. В пользу единственного источника заноса вируса генетической группы G1 на территорию Российской Федерации также указывает географическая удаленность очагов выявления вирусов A/chicken/Siberia/03/2018 (Новосибирская область), A/chicken/Amur\_Russia/17/2018 (Амурская область) и A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 (Челябинская область). К сожалению, установить источник заноса крайне затруднительно в связи с низ-

кой патогенностью вирусов подтипа H9N2 для дикой и домашней птицы, когда возможно длительное бессимптомное носительство.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований было установлено, что вирус A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 принадлежит к генетической группе G1 подтипа H9. Полногеномное секвенирование позволило установить отсутствие реассортации геномных сегментов относительно ранее выявленных на территории Российской Федерации вирусов подтипа H9N2 генетической группы G1. Установлено высокое сходство выявленного вируса с вирусом A/chicken/Israel/215/2007. Анализ молекулярных маркеров вируса свидетельствует об адаптации вируса A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 к популяции птиц.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A global perspective on H9N2 avian influenza virus / T. P. Peacock, J. James, J. E. Sealy, M. Iqbal // Viruses. – 2019. – Vol. 11 (7):e620; DOI: 10.3390/v11070620.
2. A novel genotype H9N2 influenza virus possessing human H5N1 internal genomes has been circulating in poultry in eastern China since 1998 / P. Zhang, Y. Tang, X. Liu [et al.] // J. Virol. – 2009. – Vol. 83 (17). – P. 8428–8438; DOI: 10.1128/JVI.00659-09.
3. Alexander D. J. Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa, and Australasia, 2002–2006 // Avian Dis. – 2007. – Vol. 51 (Suppl. 1). – P. 161–166; DOI: 10.1637/7602-041306R.1.
4. Avian influenza (infection with avian influenza viruses) // Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals / OIE. – 2018. – Chap. 3.3.4. – URL: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.03.04\\_AI.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf) (дата обращения: 12.11.19).
5. Avian influenza A subtype H9N2 in poultry in Pakistan / K. Naeem, A. Ullah, R. J. Manvell, D. J. Alexander // Vet. Rec. – 1999. – Vol. 145 (19). – P. 560; DOI: 10.1136/vr.145.19.560.
6. Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia / Y. J. Guo, S. Krauss, D. A. Senne [et al.] // Virology. – 2000. – Vol. 267 (2). – P. 279–288; DOI: 10.1006/viro.1999.0115.
7. Genesis of avian influenza H9N2 in Bangladesh / K. Shanmuganatham, M. M. Feeroz, L. Jones-Engel [et al.] // Emerg. Microbes Infect. – 2014. – Vol. 3 (12):e88; DOI: 10.1038/emi.2014.84.



Рис. 2. Участок предсказанной аминокислотной последовательности рецептор-связывающего домена вирусного гемагглютинаина

8. Genetic characterization of HA gene of low pathogenic H9N2 influenza viruses isolated in Israel during 2006–2012 periods / I. Davidson, I. Shkoda, N. Golender [et al.] // *Virus Genes*. – 2013. – Vol. 46 (2). – P. 255–263; DOI: 10.1007/s11262-012-0852-4.

9. Genetic conservation of hemagglutinin gene of H9 influenza virus in chicken population in Mainland China / J.-H. Liu, K. Okazaki, A. Mweene [et al.] // *Virus Genes*. – 2004. – Vol. 29 (3). – P. 329–334; DOI: 10.1007/s11262-004-7436-x.

10. Genome sequencing and phylogenetic analysis of three avian influenza H9N2 subtypes in Guangxi / Z. Xie, J. Dong, X. Tang [et al.] // *Virolog. Sin.* – 2009. – Vol. 24 (1). – P. 37–44; DOI: 10.1007/s12250-009-2985-8.

11. Infection with avian influenza viruses // *Terrestrial Animal Health Code / OIE*. – 2019. – Vol. 2, Chap. 10.4. – URL: <https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-code/access-online> (дата обращения: 12.11.19).

12. Molecular evolution of H9N2 avian influenza viruses in Israel / I. Davidson, A. Fusaro, A. Heidari [et al.] // *Virus Genes*. – 2014. – Vol. 48 (3). – P. 457–463; DOI: 10.1007/s11262-014-1037-0.

13. Phylogenetic analysis of influenza A viruses of H9 haemagglutinin subtype / J. Banks, E. C. Speidel, P. A. Harris, D. J. Alexander // *Avian Pathol.* – 2000. – Vol. 29 (4). – P. 353–359; DOI: 10.1080/03079450050118485.

14. Senne D. A. Avian influenza in the Western Hemisphere including the Pacific Islands and Australia // *Avian Dis.* – 2003. – Vol. 47 (Suppl. 3). – P. 798–805; DOI: 10.1637/0005-2086-47.s3.798.

15. Spackman E. Influenza subtype identification with molecular methods // *Methods Mol. Biol.* – 2014. – Vol. 1161. – P. 119–123; DOI: 10.1007/978-1-4939-0758-8\_11.

16. Spackman E., Killian M. L. Avian influenza virus isolation, propagation, and titration in embryonated chicken eggs // *Methods Mol. Biol.* – 2014. – Vol. 1161. – P. 125–140; DOI: 10.1007/978-1-4939-0758-8\_12.

17. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus / J. Stevens, O. Blixt, T. M. Tumpey [et al.] // *Science*. – 2006. – Vol. 312 (5772). – P. 404–410; DOI: 10.1126/science.1124513.

18. Wan H., Perez D. R. Amino acid 226 in the hemagglutinin of H9N2 influenza viruses determines cell tropism and replication in human airway epithelial cells // *J. Virol.* – 2007. – Vol. 81 (10). – P. 5181–5191; DOI: 10.1128/JVI.02827-06.

## REFERENCES

1. A global perspective on H9N2 avian influenza virus. T. P. Peacock, J. James, J. E. Sealy, M. Iqbal. *Viruses*. 2019; 11 (7):e620; DOI: 10.3390/v11070620.

2. A novel genotype H9N2 influenza virus possessing human H5N1 internal genomes has been circulating in poultry in eastern China since 1998. P. Zhang, Y. Tang, X. Liu [et al.]. *J. Virol.* 2009; 83 (17): 8428–8438; DOI: 10.1128/JVI.00659-09.

3. Alexander D. J. Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa, and Australasia, 2002–2006. *Avian Dis.* 2007; 51 (Suppl. 1): 161–166; DOI: 10.1637/7602-041306R.1.

4. Avian influenza (infection with avian influenza viruses). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE*. 2018; Chap. 3.3.4.

URL: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.03.04\\_AI.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf) (date of access: 12.11.19).

5. Avian influenza A subtype H9N2 in poultry in Pakistan. K. Naeem, A. Ullah, R. J. Manvell, D. J. Alexander. *Vet. Rec.* 1999; 145 (19): 560; DOI: 10.1136/vr.145.19.560.

6. Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia. Y. J. Guo, S. Krauss, D. A. Senne [et al.]. *Virology*. 2000; 267 (2): 279–288; DOI: 10.1006/viro.1999.0115.

7. Genesis of avian influenza H9N2 in Bangladesh. K. Shanmuganatham, M. M. Feeroz, L. Jones-Engel [et al.]. *Emerg. Microbes Infect.* 2014; 3 (12):e88; DOI: 10.1038/emi.2014.84.

8. Genetic characterization of HA gene of low pathogenic H9N2 influenza viruses isolated in Israel during 2006–2012 periods. I. Davidson, I. Shkoda, N. Golender [et al.]. *Virus Genes*. 2013; 46 (2): 255–263; DOI: 10.1007/s11262-012-0852-4.

9. Genetic conservation of hemagglutinin gene of H9 influenza virus in chicken population in Mainland China. J.-H. Liu, K. Okazaki, A. Mweene [et al.]. *Virus Genes*. 2004; 29 (3): 329–334; DOI: 10.1007/s11262-004-7436-x.

10. Genome sequencing and phylogenetic analysis of three avian influenza H9N2 subtypes in Guangxi. Z. Xie, J. Dong, X. Tang [et al.]. *Virolog. Sin.* 2009; 24 (1): 37–44; DOI: 10.1007/s12250-009-2985-8.

11. Infection with avian influenza viruses. *Terrestrial Animal Health Code. OIE*. 2019; 2, Chap. 10.4. URL: <https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-code/access-online> (date of access: 12.11.19).

12. Molecular evolution of H9N2 avian influenza viruses in Israel. I. Davidson, A. Fusaro, A. Heidari [et al.]. *Virus Genes*. 2014; 48 (3): 457–463; DOI: 10.1007/s11262-014-1037-0.

13. Phylogenetic analysis of influenza A viruses of H9 haemagglutinin subtype. J. Banks, E. C. Speidel, P. A. Harris, D. J. Alexander. *Avian Pathol.* 2000; 29 (4): 353–359; DOI: 10.1080/03079450050118485.

14. Senne D. A. Avian influenza in the Western Hemisphere including the Pacific Islands and Australia. *Avian Dis.* 2003; 47 (Suppl. 3): 798–805; DOI: 10.1637/0005-2086-47.s3.798.

15. Spackman E. Influenza subtype identification with molecular methods. *Methods Mol. Biol.* 2014; 1161: 119–123; DOI: 10.1007/978-1-4939-0758-8\_11.

16. Spackman E., Killian M. L. Avian influenza virus isolation, propagation, and titration in embryonated chicken eggs. *Methods Mol. Biol.* 2014; 1161: 125–140; DOI: 10.1007/978-1-4939-0758-8\_12.

17. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. J. Stevens, O. Blixt, T. M. Tumpey [et al.]. *Science*. 2006; 312 (5772): 404–410; DOI: 10.1126/science.1124513.

18. Wan H., Perez D. R. Amino acid 226 in the hemagglutinin of H9N2 influenza viruses determines cell tropism and replication in human airway epithelial cells. *J. Virol.* 2007; 81 (10): 5181–5191; DOI: 10.1128/JVI.02827-06.

Поступила 13.10.19

Принята в печать 20.11.19

# СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ УТИЛИЗАЦИИ И УНИЧТОЖЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОТХОДОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В СУБЪЕКТАХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

А. В. Бельчихина<sup>1</sup>, М. А. Шibaев<sup>2</sup>, И. М. Клиновитская<sup>3</sup>, А. К. Караулов<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Младший научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: belchihina@arriah.ru; ORCID 0000-0003-1442-2469

<sup>2</sup> Заведующий сектором, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: shibaev@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-9382-0109

<sup>3</sup> Старший научный сотрудник, кандидат экономических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: klinovitskaya@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-5347-8620

<sup>4</sup> Руководитель ИАЦ, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: karaulov@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-5731-5762

## РЕЗЮМЕ

В процессе хозяйственной деятельности организаций всех форм собственности, занимающихся производством, транспортировкой, заготовкой и переработкой продуктов и сырья животного происхождения, а также личных подсобных хозяйств граждан образуется довольно значительное количество биоотходов, которые являются источниками биологического загрязнения окружающей среды, способствуют сохранению очагов инфекционных заболеваний и создают реальную угрозу здоровью населения и сельскохозяйственных животных. Объекты утилизации или уничтожения биологических отходов требуют постоянного наблюдения и надзора, поскольку ухудшение эпизоотической обстановки в них может привести к возникновению и распространению болезней со значительными экологическими, экономическими и социальными последствиями. Чтобы объективно отразить сложившуюся реальную картину ветеринарно-санитарного состояния мест утилизации и уничтожения биоотходов в субъектах Российской Федерации и сформировать целостное представление о рассматриваемой проблеме в стране, были проведены сбор информации и анализ данных, полученных от сотрудников органов исполнительной власти субъектов Российской Федерации в области

ветеринарии. Рассмотрены такие показатели, как количество, форма собственности, ветеринарно-санитарное состояние, расположение и обеспеченность местами утилизации и уничтожения биоотходов животного происхождения, по состоянию на 2018 г. При проведении исследования выявлено, что в стране зарегистрировано 20 808 мест утилизации и уничтожения биологических отходов, из них основная часть приходится на скотомогильники (в т. ч. сибиреязвенные). В большинстве случаев скотомогильники (в т. ч. сибиреязвенные) не соответствуют ветеринарно-санитарным требованиям и являются бесхозными. Проведенный анализ свидетельствует о том, что в Российской Федерации сложилась напряженная ситуация в сфере обращения с биологическими отходами животного происхождения.

**Ключевые слова:** утилизация, уничтожение, биологические отходы, места утилизации и уничтожения биологических отходов, скотомогильники, сибиреязвенные скотомогильники, трупосжигательные печи, ветеринарно-санитарные утилизационные заводы, ветеринарно-санитарное состояние.

# THE STATE OF ANIMAL WASTE RENDERING AND DISPOSING SYSTEM IN THE SUBJECTS OF THE RUSSIAN FEDERATION

A. V. Belchikhina<sup>1</sup>, M. A. Shibaev<sup>2</sup>, I. M. Klinovitskaya<sup>3</sup>, A. K. Karaulov<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Junior Researcher, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: belchihina@arriah.ru; ORCID 0000-0003-1442-2469

<sup>2</sup> Head of Sector, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: shibaev@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-9382-0109

<sup>3</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Economics), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: klinovitskaya@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-5347-8620

<sup>4</sup> Head of IAC, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: karaulov@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-5731-5762

## SUMMARY

Organizations of all forms of ownership engaged in the production, transportation, procurement and processing of animal products and raw materials, as well as backyards, produce a significant amount of biological waste in the course of their activity. This waste is the source of environmental pollution, it contributes to the maintenance of infectious disease outbreaks and poses a real threat to public and livestock health. Facilities for biological waste rendering and disposal require constant monitoring and supervision, because the improper management of these facilities can lead to disease occurrence and spread with significant environmental, economic and social implications. In order to objectively reflect the real state of waste rendering and disposal facilities in the Subjects of the Russian Federation and to form a holistic view of the problem in the country, the analysis of data, collected from the veterinary executive authorities of the Subjects of the Russian Federation, were analyzed.

Such parameters as quantity, form of ownership, veterinary and sanitary condition, location and availability of animal waste rendering and disposal facilities were considered as of 2018. The study revealed 20,808 animal waste rendering and disposal facilities registered in the country, the majority of them being represented by animal burial sites (including anthrax). In most cases, animal burial sites (including anthrax) do not meet veterinary and sanitary requirements and are unattended. The analysis reveals tension in the field of animal waste management in the Russian Federation.

**Key words:** rendering, waste disposal, biological waste, biological waste rendering and disposal facilities, animal burial sites, anthrax animal burial sites, incineration furnaces, veterinary and sanitary rendering plants, veterinary and sanitary condition.

## ВВЕДЕНИЕ

Ежегодно в стране в результате хозяйственной деятельности организаций различных форм собственности (СПК, ОАО, ЗАО, ИП и др.), занимающихся производством, транспортировкой, заготовкой и переработкой продуктов и сырья животного происхождения, и личных подсобных хозяйств граждан образуется довольно значительное количество биоотходов, среди которых трупы животных и птиц, в т. ч. лабораторных; абортрованные и мертворожденные плоды; ветеринарные конфискаты (мясо, рыба, другая продукция животного происхождения), выявленные после ветеринарно-санитарной экспертизы (на хладобойнях, мясо- и рыбоперерабатывающих предприятиях, рынках, в организациях торговли, убойных пунктах и др. объектах), и другие отходы, получаемые при переработке пищевого и непищевого сырья животного происхождения [1, 2, 5, 6]. Биоотходы являются источниками загрязнения окружающей среды, способствуют сохранению очагов инфекционных заболеваний и создают реальную угрозу здоровью населения и сельскохозяйственных животных [5, 6]. В связи с этим объекты утилизации или уничтожения биоотходов требуют постоянного наблюдения и надзора, поскольку ухудшение эпизоотической обстановки в них может привести к возникновению и распространению болезней со значительными экологическими, экономическими и социальными последствиями [3, 4].

На сегодняшний день официальная информация, касающаяся данной проблемы, носит фрагментарный и ограниченный характер, что не позволяет объективно отразить сложившуюся реальную картину ветеринарно-санитарного состояния мест утилизации и уничтожения биоотходов в субъектах и сформировать целостное представление о рассматриваемой проблеме в стране.

Вследствие этого целью работы явился выбор показателей, наиболее достоверно характеризующих состояние объектов, осуществляющих утилизацию и уничтожение биологических отходов, а также сбор и оценка информации о ситуации в стране в 2018 г.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В целях проведения исследования специалистами ФГБУ «ВНИИЗЖ» была разработана форма для сбора первичных данных, включающая такие показатели, как количество, вид, форма собственности, ветеринарно-санитарное состояние, результаты обследования и обеспечения субъекта местами утилизации и уничтожения биоотходов. Также был организован единовременный и одномоментный сбор информации по указанной форме за период с 01.01.2018 по 01.01.2019. Первичные данные, полученные от сотрудников органов исполнительной власти 85 субъектов РФ в области ветеринарии, были внесены в систему оперативной отчетности «Ассоль.Экспресс» и проанализированы.

В исследовании использовались общепринятые методы анализа данных: обобщение и формализация информации, метод сравнительного анализа, методы описательной статистики. Обработка числовых данных проводилась с использованием программного обеспечения анализа данных STATISTICA 10 (StatSoft, Inc.). С целью визуализации полученных данных в виде карт использовали географическую информационную систему ArcGIS 10.6.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Организация системы утилизации и уничтожения биологических отходов в Российской Федерации*

Утилизация и уничтожение биологических отходов в РФ регламентируется «Ветеринарно-санитарными правилами сбора, утилизации и уничтожения биологических отходов», утвержденными 4 декабря 1995 г. № 13-7-2/469 [1].

В данных правилах описан алгоритм действий по сбору, утилизации и уничтожению биоотходов как для владельцев животных, независимо от способа ведения хозяйства, так и для организаций и предприятий всех форм собственности, занятых производством, транспортировкой, хранением, заготовкой и переработкой продуктов и сырья животного происхождения.

Согласно ветеринарно-санитарным правилам, биоотходы утилизируют путем переработки на ветеринарно-санитарных утилизационных заводах (цехах), сжигают в трупосжигательных печах и обеззараживают в биотермических ямах.

Следует отметить, что уничтожение биоотходов путем захоронения в землю категорически запрещено. Однако в исключительных случаях, при массовой гибели животных от стихийного бедствия и невозможности их транспортировки для утилизации, сжигания и обеззараживания в биотермических ямах, допускается захоронение биоотходов в землю по решению главного государственного ветеринарного инспектора субъекта РФ. Также запрещен сброс биоотходов в водоемы, реки, болота, бытовые мусорные контейнеры и вывоз их на свалки и полигоны для захоронения [1].

### *Количественное, видовое распределение и форма собственности мест утилизации и уничтожения биологических отходов*

Одной из основных задач в деятельности государственной ветеринарной службы субъекта РФ является проведение ветеринарного надзора и контроля за поднадзорными объектами. Одной из категории поднадзорных объектов являются места утилизации и уничтожения биоотходов (МУУБО), т. к. они являются одной из составляющих обеспечения эпизоотического благополучия территорий субъектов РФ. В связи с этим был проведен анализ состояния МУУБО в стране.

По результатам проведенного анализа следует, что на территории РФ по состоянию на 01.01.2019 зарегистрировано 20 808 МУУБО. Основное количество МУУБО представлено скотомогильниками и составляет 68% от их общего количества. Наименьшее число приходится на ветеринарно-санитарные утилизационные заводы (0,3%), и почти в равных долях представлено количество сибирязвенных скотомогильников (15%) и трупосжигательных печей (16,7%) (рис. 1).

В стране расположено 14 109 скотомогильников, которые зарегистрированы почти во всех субъектах страны, за исключением г. Москвы, г. Санкт-Петербурга, Республики Марий Эл, Республики Адыгеи, Магаданской области и Чукотского автономного округа. Около половины скотомогильников (40%) сосредоточено в Приволжском федеральном округе. В 40 субъектах страны данный показатель варьирует в диапазоне от 11 до 200 ед., а для 15 субъектов не превышает 10 ед. (рис. 2). Единичное количество скотомогильников зарегистрировано в Чувашской Республике, Республике Ингушетии, Курской области и г. Севастополе.

Сибирязвенные скотомогильники зарегистрированы на территории 61 субъекта страны в количестве

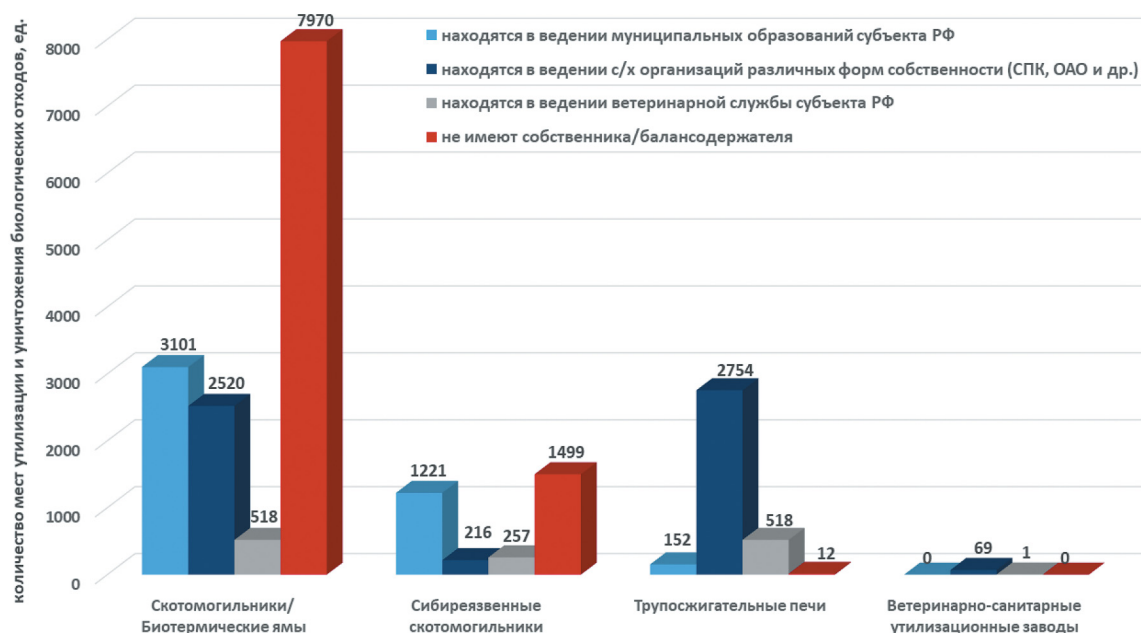


Рис. 1. Общее количество мест утилизации и уничтожения биологических отходов в РФ (по состоянию на 2018 г.)

3193 ед., половина из них сосредоточена в таких субъектах, как Удмуртская Республика (101), Кемеровская (103), Тверская (145), Нижегородская (231) области, республики Мордовия (251), Якутия (285) и Татарстан (808). Для трети субъектов (33) данный показатель не превышает 20 ед.

Следует отметить, что в настоящее время в стране остро стоит вопрос с наличием собственника у скотомогильников (в т. ч. сибиреязвенных), так как 7970 ско-

томогильников и 1499 сибиреязвенных скотомогильников являются бесхозными. А значит, с определенной долей уверенности можно предположить, что указанные скотомогильники (в т. ч. сибиреязвенные) находятся в ненадлежащем ветеринарно-санитарном состоянии, и не исключается вероятность выноса из них возбудителей различных инфекционных болезней животных во внешнюю среду, что в свою очередь создает реальные угрозы для здоровья населения и животных.

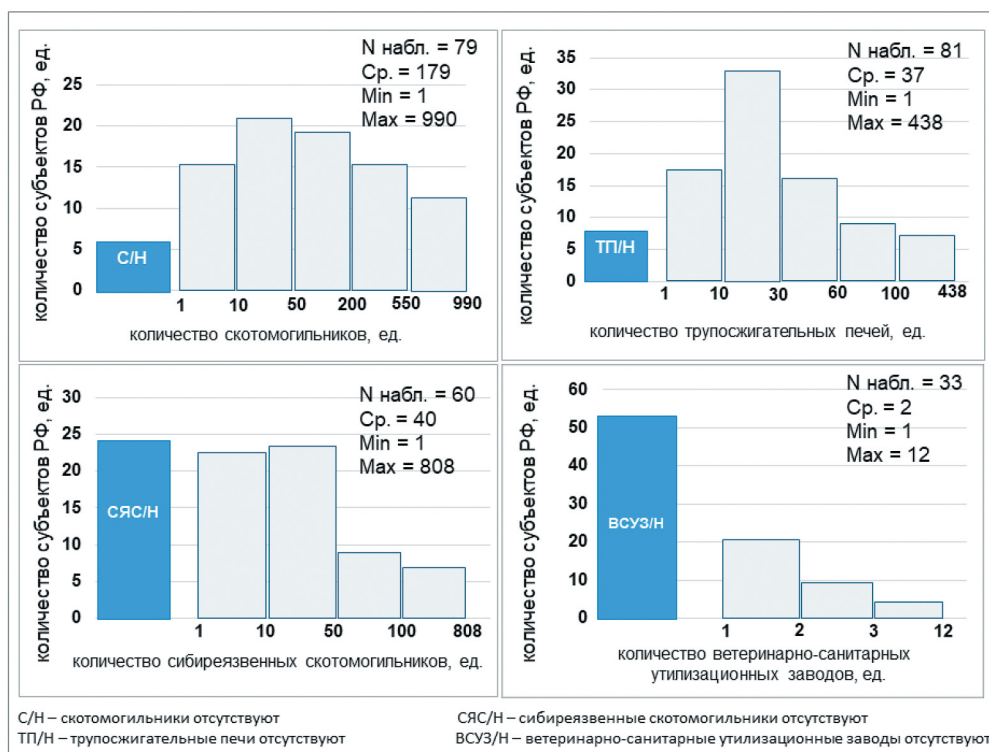


Рис. 2. Количественное распределение мест утилизации и уничтожения биологических отходов в РФ (по состоянию на 2018 г.)

Количество трупосжигательных печей (в т. ч. инсинераторов и кремационных печей) в стране составляет 3436 ед., расположены они почти во всех субъектах РФ, за исключением Карачаево-Черкесской Республики, Республики Татарстан и Самарской области. Основное количество (40%) трупосжигательных печей находится в диапазоне от 11 до 30 ед. (рис. 2). Можно отметить регионы со значительным количеством (более 100 ед.) трупосжигательных печей, которые расположены в Ленинградской (112 ед.), Владимирской (140 ед.), Московской (141 ед.), Вологодской (167 ед.) областях, Удмуртской Республике (173 ед.), Ставропольском (191 ед.) и Краснодарском (438 ед.) краях.

Также в стране насчитывается 70 ветеринарно-санитарных утилизационных заводов/цехов, которые расположены на территории 33 субъектов РФ (рис. 2), при этом основная доля их сконцентрирована в Центральном, Северо-Западном и Дальневосточном федеральных округах, в то время как на территории Северо-Кавказского федерального округа не зарегистрировано ни одного. Наибольшее их количество отмечается на территории Сахалинской (12 ед.), Ленинградской (9 ед.), Новгородской (5 ед.) и Белгородской (4 ед.) областей, в остальных субъектах РФ в основном зарегистрировано по одному ветеринарно-санитарному утилизационному заводу/цеху.

#### **Обеспеченность местами утилизации и уничтожения биологических отходов**

Обеспеченность субъектов страны МУУБО определяется исходя из объемов биоотходов животного происхождения, образующихся на их территории в результате хозяйственной деятельности населения и хозяйствующих субъектов. Каждый вид МУУБО обладает определенным потенциалом и предназначен для утилизации и уничтожения определенных категорий биоотходов. Исходя из этого, целесообразно проводить оценку обеспеченности субъектов страны в разрезе отдельных видов объектов утилизации и уничтожения биологических отходов.

Из результатов проведенного анализа следует, что для большинства субъектов РФ отмечается благоприятная ситуация в отношении обеспеченности скотомогильниками, а именно для 64 субъектов (75%) обеспеченность составила 100%. Однако в 21 субъекте РФ существует дополнительная потребность в данных объектах, а показатель обеспеченности варьирует в диапазоне от 3 до 93% (рис. 3).

Проведенный анализ показал, что более половины субъектов страны (47) в полном объеме (100%) обеспечены трупосжигательными печами (в т. ч. инсинераторами, кремационными печами), а для оставшихся 38 субъектов РФ обеспеченность находится в диапазоне от 1 до 97%. Наибольшая потребность в данных объектах выявлена в субъектах Сибирского (35%) и Северо-Кавказского (68%) федеральных округов.

Согласно данным, полученным в ходе проведения оценки обеспеченности субъектов РФ ветеринарно-санитарными утилизационными заводами, выявлено, что на территории 53 субъектов они отсутствуют, но потребность в данных предприятиях существует только в 22 субъектах РФ (рис. 3). Для остальных 32 субъектов страны отмечается обеспеченность ветеринарно-санитарными утилизационными заводами в полном объеме (100%), за исключением Амурской, Свердловской областей и Приморского края, где обеспеченность составила менее 50%.

При выявлении в субъектах низкой обеспеченности МУУБО различных видов требуется скорейшая коррекция ситуации по данному вопросу. Поскольку создаются все условия и предпосылки для несанкционированного захоронения биоотходов, данный процесс становится неконтролируемым со стороны ветеринарных служб субъектов РФ, что в конечном итоге препятствует стабильности и улучшению эпизоотической ситуации на вверенных им территориях.

#### **Контроль ветеринарно-санитарного состояния мест уничтожения биологических отходов**

На следующем этапе исследования провели анализ ситуации в субъектах страны по уровню проведения государственными ветеринарными службами ветеринарно-санитарного обследования скотомогильников в отчетном периоде. Из полученных данных следует, что в большинстве регионов обследованию подвергались все зарегистрированные скотомогильники. Исключение составили 15 субъектов РФ, в которых государственными ветеринарными службами контрольные мероприятия были проведены не в полном объеме, а именно 912 скотомогильников не были обследованы. Значительное количество необследованных скотомогильников отмечается в Алтайском (95 ед.), Пермском (199 ед.) краях, Тамбовской (100 ед.), Калужской (155 ед.) областях и Республике Дагестан (242 ед.). Для оставшихся 10 субъектов количество необследованных

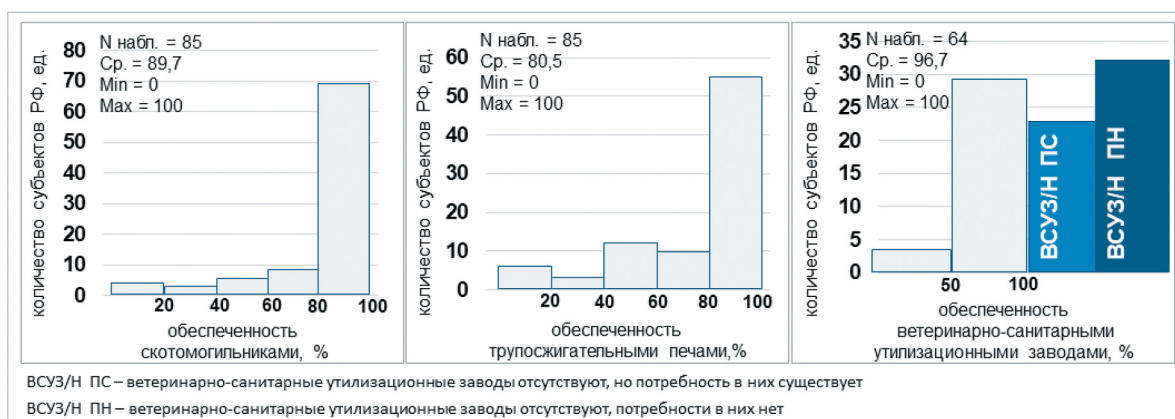


Рис. 3. Уровень обеспеченности субъектов РФ местами утилизации и уничтожения биологических отходов (по состоянию на 2018 г.)

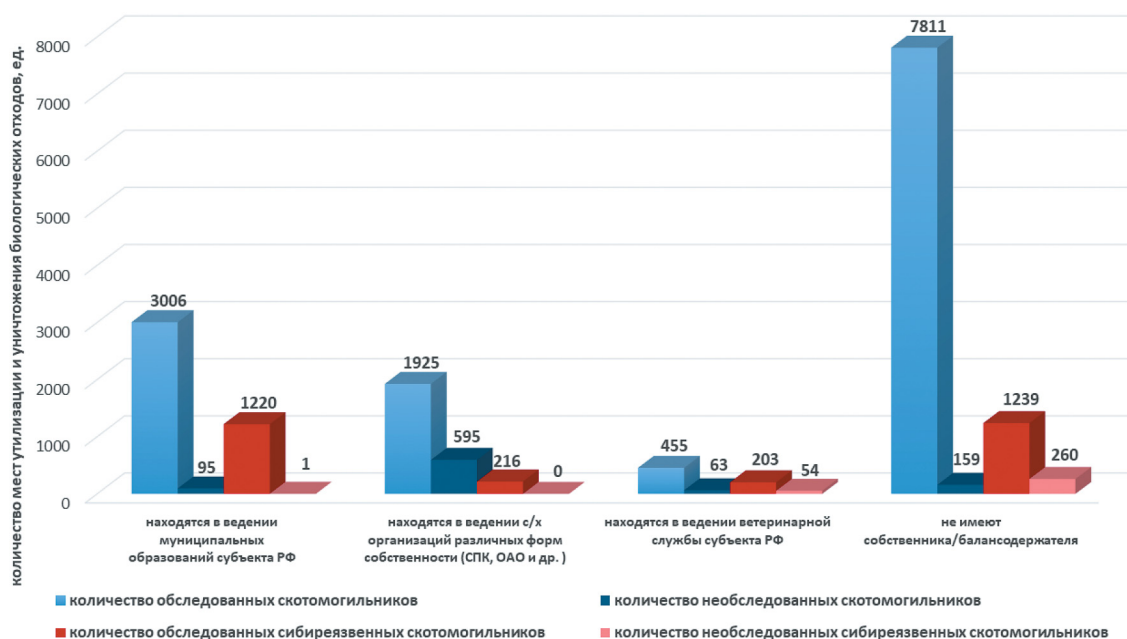


Рис. 4. Количество обследованных и необследованных скотомогильников (в т. ч. сибиреязвенных) в РФ (по состоянию на 2018 г.)

скотомогильников находится в диапазоне от 1 до 23 ед. Основная масса всех необследованных скотомогильников находится на праве хозяйственного ведения у организаций различных форм собственности (СПК, ОАО, ИП и т. д.) (рис. 4).

Что касается сибиреязвенных скотомогильников, то следует отметить, что 315 единиц не были охвачены контрольными мероприятиями в таких субъектах, как Республика Саха (Якутия) (237 ед.), Пермский край (54 ед.), Липецкая область (17 ед.), Еврейская автономная область (6 ед.) и Алтайский край (1 ед.). В большинстве случаев обследованию не подвергались бесхозные сибиреязвенные скотомогильники (рис. 4).

В любом случае, независимо от количества необследованных скотомогильников, а также их вида, можно предположить, что их ветеринарно-санитарное состояние можно считать неудовлетворительным, что создает потенциальную угрозу для эпизоотического благополучия на определенных территориях, в особенности это относится к сибиреязвенным захоронениям.

#### **Ветеринарно-санитарное состояние скотомогильников**

В процессе утилизации и уничтожения биоотходов животного происхождения возникает опасность распространения инфекционного агента и контаминации окружающей среды. В первую очередь это связано с тем, что в скотомогильниках обеззараживание биоотходов происходит в течение достаточно длительного времени. Однако наибольшую опасность представляют объекты утилизации, которые находятся в неудовлетворительном ветеринарно-санитарном состоянии.

Поэтому была проведена оценка ситуации в субъектах страны по такому показателю, как удельный вес числа скотомогильников, не соответствующих ветеринарно-санитарным нормам. По результатам анализа выявлено, что около 60% (8329 ед.) скотомогильников в стране не соответствуют ветеринарно-санитарным требованиям. Располагаются они на территории 65 субъектов РФ, при этом в половине регионов зна-

чение по данному показателю находится в пределах от 80 до 100% (рис. 5). Основная масса (72%) скотомогильников, не соответствующих ветеринарно-санитарным требованиям, являются бесхозными.

Подобная ситуация отмечается и с санитарным состоянием сибиреязвенных скотомогильников. Так, из 61 субъекта страны, где имеются указанные скотомогильники, только в 23 регионах все они находятся в удовлетворительном санитарном состоянии. Критическая ситуация отмечается для 11 субъектов РФ, где все имеющиеся сибиреязвенные скотомогильники не соответствуют ветеринарно-санитарным требованиям. В остальных субъектах удельный вес числа сибиреязвенных скотомогильников, не соответствующих ветеринарно-санитарным требованиям, колеблется от 2 до 99%.

#### **Расположение скотомогильников относительно гидрографических объектов**

В ветеринарном законодательстве определены ветеринарно-санитарные нормы, запрещающие размещение скотомогильников в водоохранной зоне и зоне подтопления/затопления. Однако в некоторых субъектах РФ исполнение ветеринарного законодательства в данном вопросе осуществляется не в полном объеме. А именно: в стране зарегистрировано 26 скотомогильников, которые расположены в водоохранной зоне на территории Республики Хакасии (1 ед.), Камчатского края (2 ед.), Тамбовской области (5 ед.), Республики Татарстан (7 ед.) и Кабардино-Балкарской Республики (11 ед.). Количество расположенных в водоохранной зоне сибиреязвенных скотомогильников составляет 45 ед., и зарегистрированы они на территории Новгородской (1 ед.), Ивановской (2 ед.), Кировской (2 ед.), Челябинской (2 ед.), Нижегородской (5 ед.) областей, Кабардино-Балкарской Республики (5 ед.) и Республики Татарстан (28 ед.), при этом собственник/балансодержатель установлен не у всех (табл.).

Скотомогильники, попадающие в зоны затопления, зарегистрированы в Республике Бурятия (1 ед.),

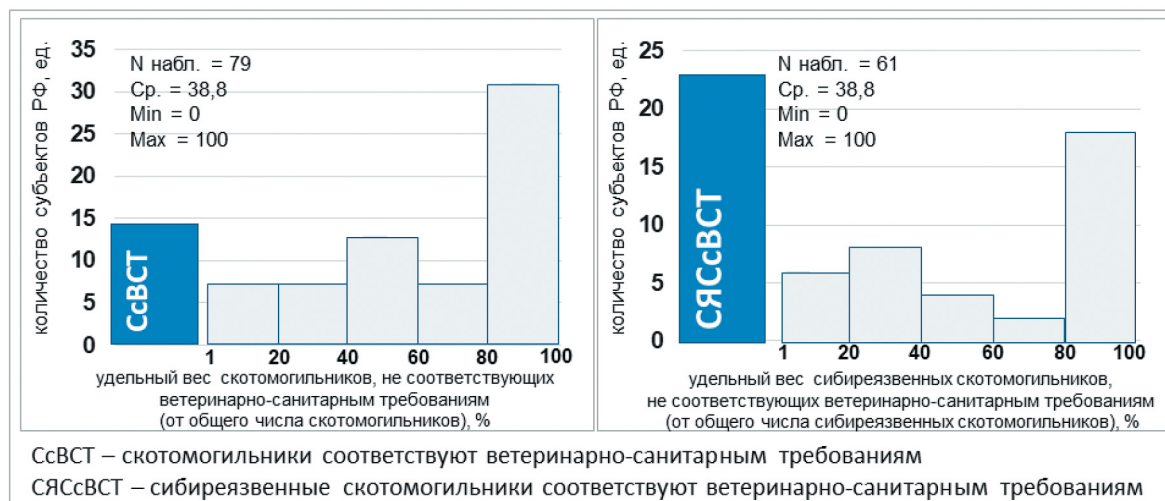


Рис. 5. Уровень ветеринарно-санитарного состояния скотомогильников (в т. ч. сибиреязвенных) в РФ (по состоянию на 2018 г.)

Алтайском крае (3 ед.) и Республике Дагестан (14 ед.), общее их количество составляет 18 ед., из них 4 скотомогильника являются бесхозными. Кроме того, все скотомогильники данной категории, расположенные в Республике Дагестан, являются действующими и не соответствуют ветеринарно-санитарным требованиям. Также зарегистрировано 15 попадающих в зону затопления сибиреязвенных скотомогильников, расположенных на территории Еврейской автономной области (1 ед.), Республики Бурятия (1 ед.), Алтайского

края (1 ед.), Ивановской области (2 ед.), Кабардино-Балкарской Республики (2 ед.), Республики Марий Эл (3 ед.) и Нижегородской области (5 ед.), при этом треть из них являются бесхозными (табл.). Также в некоторых субъектах РФ не исполняются ветеринарно-санитарные требования в части размещения скотомогильников относительно гидрографических объектов. Около сотни скотомогильников (в т. ч. сибиреязвенных) расположены на территории водоохранной зоны и зоны затопления.

#### Таблица

Количество скотомогильников (в т. ч. сибиреязвенных), расположенных в зоне затопления и водоохранной зоне на территории субъектов РФ (по состоянию на 2018 г.)

| Субъект РФ                                                                   |                                          | Ивановская область | Тамбовская область | Новгородская область | Республика Дагестан | Кабардино-Балкарская Республика | Кировская область | Нижегородская область | Республика Татарстан | Республика Марий Эл | Челябинская область | Алтайский край | Республика Хакасия | Камчатский край | Еврейская АО | Республика Бурятия | ВСЕГО в РФ |
|------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|---------------------|---------------------------------|-------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|----------------|--------------------|-----------------|--------------|--------------------|------------|
| Количество мест уничтожения биоотходов, которые попадают в водоохранную зону | скотомогильники                          | 0                  | 5                  | 0                    | 0                   | 11                              | 0                 | 0                     | 7                    | 0                   | 0                   | 0              | 1                  | 2               | 0            | 0                  | 26         |
|                                                                              | бесхозные скотомогильники                | 0                  | 0                  | 0                    | 0                   | 11                              | 0                 | 0                     | 0                    | 0                   | 0                   | 0              | 0                  | 0               | 0            | 0                  | 11         |
|                                                                              | сибиреязвенные скотомогильники           | 2                  | 0                  | 1                    | 0                   | 5                               | 2                 | 5                     | 28                   | 0                   | 2                   | 0              | 0                  | 0               | 0            | 0                  | 45         |
|                                                                              | бесхозные сибиреязвенные скотомогильники | 2                  | 0                  | 1                    | 0                   | 1                               | 1                 | 0                     | 0                    | 0                   | 2                   | 0              | 0                  | 0               | 0            | 0                  | 7          |
| Количество мест уничтожения биоотходов, которые попадают в зоны затопления   | скотомогильники                          | 0                  | 0                  | 0                    | 14                  | 0                               | 0                 | 0                     | 0                    | 0                   | 0                   | 3              | 0                  | 0               | 0            | 1                  | 18         |
|                                                                              | бесхозные скотомогильники                | 0                  | 0                  | 0                    | 0                   | 0                               | 0                 | 0                     | 0                    | 0                   | 0                   | 3              | 0                  | 0               | 0            | 1                  | 4          |
|                                                                              | сибиреязвенные скотомогильники           | 1                  | 0                  | 0                    | 0                   | 2                               | 0                 | 5                     | 0                    | 3                   | 0                   | 1              | 0                  | 0               | 1            | 1                  | 14         |
|                                                                              | бесхозные сибиреязвенные скотомогильники | 1                  | 0                  | 0                    | 0                   | 1                               | 0                 | 0                     | 0                    | 0                   | 0                   | 1              | 0                  | 0               | 1            | 1                  | 5          |

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Объекты утилизации и уничтожения биологических отходов являются источниками загрязнения окружающей среды, в том числе подземных и поверхностных вод, способствуют сохранению очагов инфекционных заболеваний животных, что, в свою очередь, создает реальные угрозы здоровью человека и животных.

Наиболее значимыми показателями для характеристики состояния объектов, осуществляющих утилизацию и уничтожение биоотходов, выбраны: количественное, видовое распределение и форма собственности мест утилизации и уничтожения биологических отходов; обеспеченность местами утилизации и уничтожения биологических отходов; контроль ветеринарно-санитарного состояния мест уничтожения биологических отходов; ветеринарно-санитарное состояние скотомогильников и расположение скотомогильников относительно гидрографических объектов, т. к. именно данные показатели связаны с потенциальными угрозами для эпизоотического благополучия в случае реализации неблагоприятных сценариев.

Результаты анализа показывают, что в субъектах РФ отмечается напряженная ситуация в сфере обращения, утилизации и уничтожения биоотходов. В первую очередь это связано с тем, что более половины скотомогильников (в т. ч. сибиреязвенных) не соответствуют ветеринарно-санитарным требованиям. При этом ситуация усугубляется тем, что значительная часть скотомогильников (в т. ч. сибиреязвенных) не имеет собственника/балансодержателя. В связи с этим в настоящее время возникает необходимость в усовершенствовании существующей системы оценки состояния мест утилизации и уничтожения биологических отходов животного происхождения в субъектах РФ. Модернизация данной системы оценки в первую очередь должна включать в себя разработку единых форм учета для скотомогильников, сибиреязвенных скотомогильников, трупосжигательных печей (в т. ч. инсинераторов и кремационных печей) и ветеринарно-санитарных утилизационных заводов и создание единых проверочных листов (чек-листов, списков контрольных вопросов) с целью использования их ветеринарными службами субъектов РФ в проведении плановых проверок в отношении объектов утилизации и уничтожения биологических отходов.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ветеринарно-санитарные правила сбора, утилизации и уничтожения биологических отходов: утв. Минсельхозпродом РФ 04.12.1995 г. № 13-7-2/469) (ред. от 16.08.2007). – URL: <http://docs.cntd.ru/document/9015471> (дата обращения: 14.05.19).
2. ГОСТ 30772-2001. Межгосударственный стандарт. Ресурсосбережение. Обращение с отходами. Термины и определения: межгосударственный стандарт. – М.: Стандартинформ, 2001. – 16 с.
3. О ветеринарии: закон РФ от 14.05.1993 г. № 4979-1 (ред. от 28.12.2018). – URL: <https://base.garant.ru/10108225/>.
4. О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения: Федеральный закон РФ от 30.03.1999 г. № 52-ФЗ (ред. от 26.07.2019). – URL: <https://base.garant.ru/12115118>.
5. СанПиН 2.1.7.2790-10. Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами: утв. Постановлением Главного гос. сан. врача РФ от 09.12.2010 г. № 163; зарегистрировано в Минюсте РФ 17.02.2011 г. № 19871). – URL: <http://docs.cntd.ru/document/902251609>.
6. Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011. «О безопасности пищевой продукции»: утв. решением Комиссии Таможенного союза 09.12.2011 г. № 880. – М.: Система КонсультантПлюс. Эксперт-приложение, 2012. – URL: [http://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_124768/](http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_124768/) (дата обращения: 14.05.19).

## REFERENCES

1. Veterinary and sanitary rules for collection, rendering and disposal of biological waste [Veterinarno-sanitarnye pravila sbora, utilizacii i уничтожения биологических отходов] No. 13-7-2/469 of 04.12.1995: approved by the Ministry of Agriculture of the Russian Federation (amended on 16.08.2007). URL: <http://docs.cntd.ru/document/9015471> (date of access: 14.05.19) (in Russian).
2. GOST 30772-2001. Interstate standard. Resource saving. Waste treatment. Terms and definitions: interstate standard [ГОСТ 30772-2001. Mezghosudarstvennyj standart. Resursosberezhenie. Obrashchenie s othodami. Terminy i opredeleniya: mezghosudarstvennyj standart]. M.: Standartinform, 2001 (in Russian).
3. On veterinary medicine [O veterinarii]: Law of the Russian Federation No. 4979-1 of 14.05.1993 (amended on 28.12.2018). URL: <https://base.garant.ru/10108225/> (in Russian).
4. On sanitary and epidemiological welfare of the population [O sanitarno-epidemiologicheskom blagopoluchii naseleniya]: Federal Law of the Russian Federation No. 52-FZ of 30.03.1999 (amended on 26.07.2019). URL: <https://base.garant.ru/12115118> (in Russian).
5. SanPiN 2.1.7.2790-10. Sanitary and epidemiological requirements for medical waste management [SanPiN 2.1.7.2790-10. Sanitarno-epidemiologicheskie trebovaniya k obrashcheniyu s medicinskimi othodami]: approved by Resolution of the Chief medical officer of the Russian Federation No. 163 of 09.12.2010; registered in the Ministry of justice of the Russian Federation No. 19871 of 17.02.2011). URL: <http://docs.cntd.ru/document/902251609> (in Russian).
6. Technical regulations of the Customs Union TR CU 021/2011. "On safety of food products" [Tekhnicheskij reglament Tamozhennogo soyuza TR TS 021/2011. «O bezopasnosti pishchevoj produkcii»]: approved by decision of the Customs Union Commission No. 880 of 09.12.2011. M.: ConsultantPlus System. Expert-Application, 2012. URL: [http://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_124768/](http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_124768/) (date of access: 14.05.19) (in Russian).

Поступила 11.10.19

Принята в печать 01.11.19

УДК 619:331.108.2

DOI: 10.29326/2304-196X-2019-4-31-61-66

# СТРУКТУРА И ДВИЖЕНИЕ КАДРОВ ГОСУДАРСТВЕННОЙ ВЕТЕРИНАРНОЙ СЛУЖБЫ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

И. М. Клиновицкая<sup>1</sup>, М. А. Шибайев<sup>2</sup>, А. В. Бельчихина<sup>3</sup>, А. К. Караулов<sup>4</sup><sup>1</sup> Старший научный сотрудник, кандидат экономических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: klinovitskaya@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-5347-8620<sup>2</sup> Заведующий сектором, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: shibaev@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-9382-0109<sup>3</sup> Младший научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: belchikhina@arriah.ru; ORCID ID 0000-0003-1442-2469<sup>4</sup> Руководитель ИАЦ, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: karaulov@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-5731-5762

## РЕЗЮМЕ

Главными ресурсами любой организации являются трудовые ресурсы, от деятельности которых зависит эффективность работы данной организации. В статье представлен анализ количественных и качественных показателей, характеризующих численный состав, структуру и движение кадров государственной ветеринарной службы Российской Федерации в 2018 г. Все показатели рассматривали на разных уровнях организации ветеринарной службы: в целом по ветеринарной службе страны, на уровне органов исполнительной власти субъектов РФ в области ветеринарии (в том числе в подразделениях госветнадзора), в учреждениях лечебно-профилактического звена и учреждениях лабораторно-диагностического профиля. В работе рассмотрена структура ветеринарных кадров государственной ветеринарной службы страны по образованию, стажу работы, возрасту, гендерному признаку. Для изучения движения кадрового потенциала государственной ветеринарной службы в связи с приемом и выбытием специ-

алистов были рассчитаны и проанализированы ряд показателей: коэффициент оборота кадров по приему, коэффициент оборота кадров по выбытию, коэффициент общего оборота кадров, коэффициент восполнения кадров. В 2018 г. в госветслужбе РФ насчитывалось порядка 52 304 ветеринарных специалистов, большая часть которых (81%) трудоустроена в учреждения лечебно-профилактического звена. Основной состав ветеринарных специалистов представлен сотрудниками с высшим образованием (75%), со стажем работы более 10 лет (55%), возрастной категории 36–50 лет (43%), женского пола (62%). Результаты анализа кадрового потенциала ветеринарной службы позволяют определить слабые стороны кадровой политики и выработать мероприятия по их корректровке в случае необходимости.

**Ключевые слова:** ветеринарная служба, уровни организации ветеринарной службы, ветеринарный специалист, структура кадров, движение кадров.

UDC 619:331.108.2

# STRUCTURE AND STAFF MOVEMENT WITHIN STATE VETERINARY SERVICE OF RUSSIAN FEDERATION

I. M. Klinovitskaya<sup>1</sup>, M. A. Shibayev<sup>2</sup>, A. V. Belchikhina<sup>3</sup>, A. K. Karaulov<sup>4</sup><sup>1</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Economy), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: klinovitskaya@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-5347-8620<sup>2</sup> Head of Sector, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: shibaev@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-9382-0109<sup>3</sup> Junior Researcher, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: belchikhina@arriah.ru; ORCID ID 0000-0003-1442-2469<sup>4</sup> Head of IAC, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: karaulov@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-5731-5762

## SUMMARY

Major resources for any organization are human resources which condition the company's performance. The article presents the analysis of quantitative and qualitative indicators of the number, structure and movement of staff of the state veterinary service of the Russian Federation in 2018. All indicators were examined at different organizational levels of the veterinary service: the country's veterinary service as a whole, at the level of the executive veterinary bodies of Russian subjects (including the state veterinary surveillance divisions), establishments for control and prevention and those for laboratory analysis and diagnosis. The work deals with the staff structure of the country's state veterinary service categorized by education, length of service, age and gender. To study the movement of staff of the state veterinary service connected to recruitment and retirement of specialists, we calculated and analyzed a

number of parameters: employee turnover rate for recruitment, employee turnover rate for leaving, total staff turnover rate, staff replacement rate. In 2018 the Russian state veterinary service comprised around 52,304 veterinary specialists, the majority of them (81%) being employed at establishments for control and prevention. The core of veterinary specialists is represented by employees with a university degree (75%), work experience of more than 10 years (55%), belonging to age group of 36–50 years (43%), female (62%). The results of analysis of human resources of the veterinary service allow us to determine the weak points of personnel policy and work out measures to deal with them if the need arises.

**Key words:** veterinary service, organizational levels of veterinary service, veterinary specialist, staff structure, staff movement.

## ВВЕДЕНИЕ

Среди всей совокупности ресурсов любой организации важное место занимают трудовые ресурсы, от качества, эффективности, квалификации и опыта работы которых зависят результаты ее деятельности. Часть трудовых ресурсов, имеющих специальную подготовку и образование, составляют кадры организации или в целом отдельной отрасли, к которой также относится и государственная ветеринарная служба Российской Федерации [5, 8].

Важными задачами анализа трудовых ресурсов государственной ветеринарной службы РФ являются определение показателей, связанных с численностью, составом, структурой, квалификацией и движением ветеринарных кадров.

Данные показатели рассматривали в разрезе категорий персонала в зависимости от характера выполняемых ими функций:

- ветеринарные специалисты, работающие в учреждениях лечебно-профилактического звена (СББЖ, ветеринарные центры, ветеринарные лечебницы, ветеринарные участки и т. п.);
- ветеринарные специалисты, работающие в учреждениях лабораторно-диагностического профиля (ветеринарно-диагностические лаборатории различного уровня);
- ветеринарные специалисты, работающие в органах исполнительной власти субъектов РФ в области ветеринарии, внутри которых выделено подразделение по осуществлению государственного ветеринарного надзора.

Состав и количественные соотношения отдельных групп и категорий сотрудников описывает структура кадров [4, 8, 11]. Структуру кадров государственной ветеринарной службы рассматривали по следующим категориям:

- уровень организации государственной ветеринарной службы;
- образование;
- стаж работы;
- возраст;
- гендерный признак.

Поскольку официальная и доступная информация по кадровым ресурсам госветслужбы РФ носит достаточно ограниченный характер, то задачей данного исследования явился выбор наиболее значимых показателей, их сбор и комплексный анализ, позволивший оценить многие количественные и качественные показатели трудовых ресурсов. Кроме того, впервые проанализировано движение кадров в государственной ветеринарной службе страны.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Практической основой для анализа трудовых ресурсов государственной ветеринарной службы РФ послужили сведения, предоставленные органами исполнительной власти субъектов РФ в области ветеринарии за 2018 г. по разработанной в ФГБУ «ВНИИЗЖ» форме для сбора первичных данных. Информация поступила от 84 субъектов РФ, кроме Забайкальского края, по которому были использованы доступные данные за 2017 г.

Методологической и теоретической основой для исследования явились публикации современных авторов, посвященные проблемам анализа трудовых ресурсов.

В работе использовали аналитический метод; метод сравнительного анализа, сводки и группировки, описательной статистики; экономико-математические расчеты.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одними из основных характеристик персонала организации являются его численность и структура. В государственной ветеринарной службе РФ в 2018 г. всего насчитывалось 52 304 ветеринарных специалиста (табл. 1).

Как видно из представленного материала, основное количество ветспециалистов (81,2%) работает в учреждениях лечебно-профилактического звена, то есть там, где проводятся первичные ветеринарные мероприятия по предупреждению и ликвидации заболеваний животных. Значительную долю (15,3%) составляют сотрудники учреждений лабораторно-диагностического профиля. В органах исполнительной власти субъектов РФ в области ветеринарии занято 3,5% ветспециалистов, из них  $\frac{3}{4}$  являются специалистами, осуществляющими региональный государственный ветеринарный надзор.

Наряду с количественным обеспечением ветеринарной службы интерес представляет качественный состав ветспециалистов, оцениваемый по образованию, стажу работы в учреждениях государственной ветеринарной службы, возрасту, полу [2, 4, 7].

**Структура кадров по образованию.** Деятельность государственной ветеринарной службы требует от специалистов наличия определенных знаний, опыта и квалификации.

Удельный вес ветспециалистов с высшим образованием составляет около 75%, со средним образованием – около 25%, что позитивным образом характеризует квалификационный уровень ветеринарных специалистов государственной ветеринарной службы РФ. Следует отметить, что в штате государственной ветеринарной службы насчитывается 679 ветеринарных специалистов, имеющих ученую степень кандидата или доктора наук.

**Структура кадров по стажу работу в госветслужбе РФ.** Для анализа распределения ветеринарных кадров по данному показателю были выделены четыре группы ветспециалистов в зависимости от стажа их работы в учреждениях государственной ветеринарной службы (рис. 1).

На всех уровнях организации ветеринарной службы наименьший удельный вес в структуре кадров (от 5 до 7%) занимают специалисты со стажем работы менее одного года, большая же часть персонала (от 47 до 56%) работает в данной структуре более 10 лет. Значительную долю (от 23 до 36%) составляют ветеринарные кадры,

**Таблица 1**  
Численность ветспециалистов государственной ветеринарной службы РФ

| Организационная структура госветслужбы                                          | Количество ветспециалистов, чел. |
|---------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Всего в госветслужбе РФ, в том числе:                                           | 52 304 (100%)                    |
| – в органе исполнительной власти субъектов РФ, из них специалисты Госветнадзора | 1840 (3,5%)<br>1292 (2,5%)       |
| – в учреждениях лечебно-профилактического звена                                 | 42 478 (81,2%)                   |
| – в учреждениях лабораторно-диагностического профиля                            | 7986 (15,3%)                     |

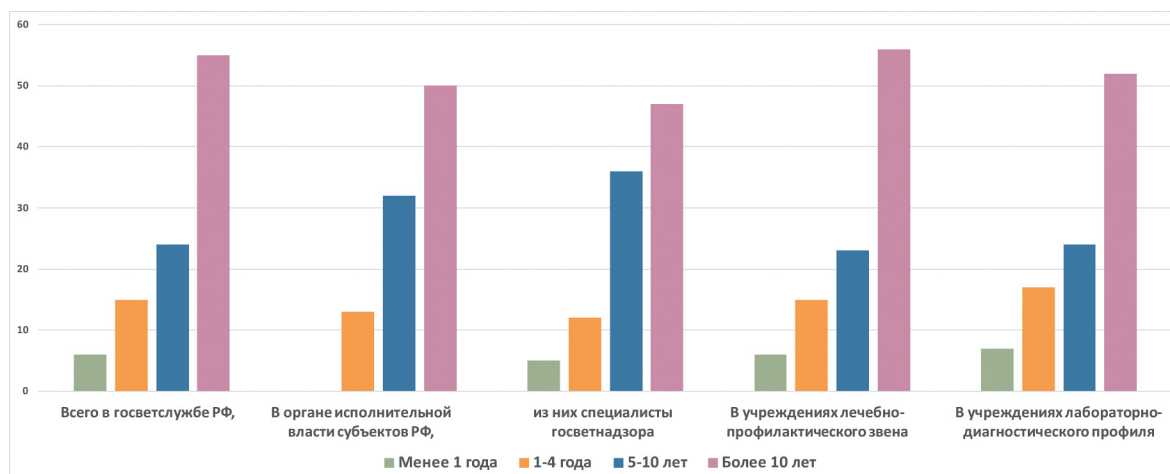


Рис. 1. Распределение кадров по стажу работы в учреждениях госветслужбы РФ, %

имеющие стаж работы от 5 до 10 лет. Так как стаж работы оказывает значительное влияние на профессиональные качества ветеринарных специалистов, то можно сделать вывод, что государственная ветеринарная служба РФ укомплектована опытными сотрудниками. Также продолжительный стаж работы в госветслужбе большей части ветеринарных специалистов характеризует стабильность кадров в данной структуре и в определенной степени – удовлетворенность условиями труда [3, 12]. По мнению некоторых исследователей, работник приобретает тем большую ценность для организации, чем дольше он в ней работает [8].

**Структура кадров по возрасту.** Традиционным показателем статистики трудовых ресурсов является средний возраст специалистов. Однако данный показатель, представляющий собой усредненное значение, не является достаточно информативным. Поэтому более

показательным является представление возрастной структуры специалистов госветслужбы с разбивкой на группы (рис. 2).

При исследовании возрастной структуры трудовых ресурсов были выделены 4 возрастные категории, имеющие, на наш взгляд, свои профессиональные особенности: молодые (до 35 лет), зрелые кадры (36–50 лет), кадры предпенсионного возраста (51–54/59 лет) и пенсионного возраста (55/60 лет и старше).

На основании приведенных данных можно сделать вывод, что как в целом, так и на каждом уровне организации госветслужбы РФ преобладают специалисты в возрасте от 36 до 50 лет. Именно на эти годы приходится пик трудовой активности человека. Специалистов данного возраста отличает большая продуктивность труда, высокий трудовой потенциал и хорошая ориентация в профессии, что влияет на качество работы.

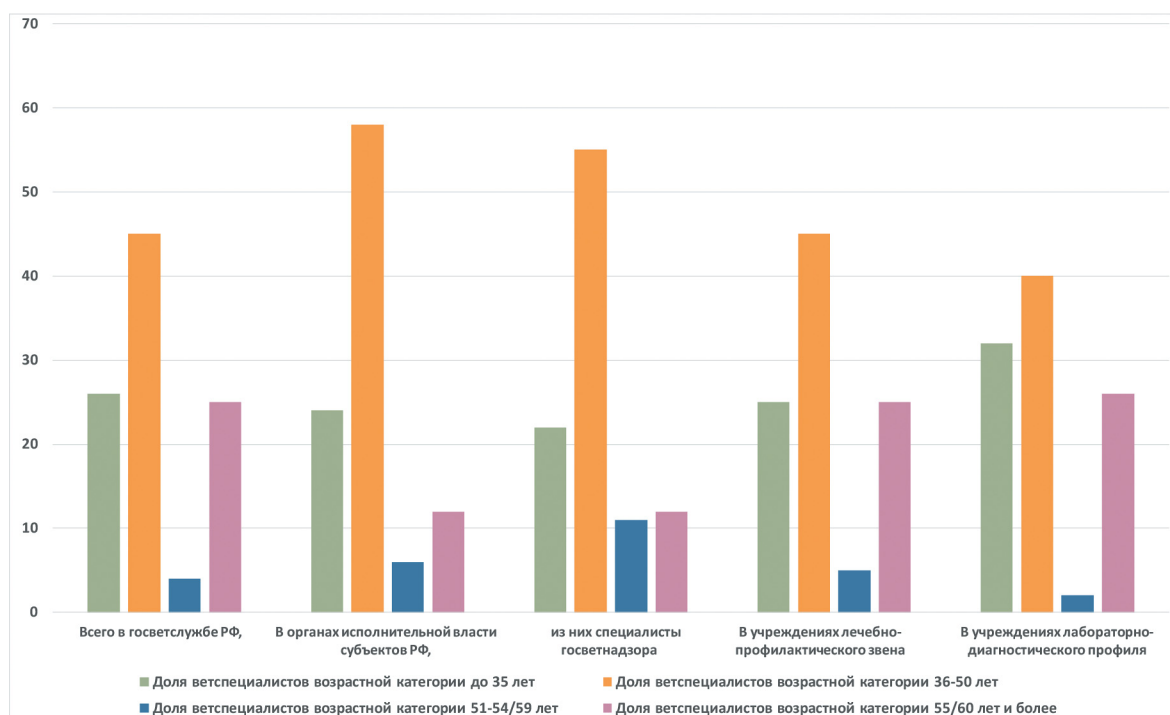


Рис. 2. Распределение ветеринарных кадров госветслужбы по возрасту, %

**Таблица 2**  
**Обороты ветспециалистов госветслужбы РФ по приему и выбытию, %**

| Уровень организации госветслужбы                                                 | Коэффициент, % |            |
|----------------------------------------------------------------------------------|----------------|------------|
|                                                                                  | по приему      | по выбытию |
| Всего в госветслужбе РФ, в том числе:                                            | 10             | 11         |
| – в органе исполнительной власти субъектов РФ (из них специалисты госветнадзора) | 9 (9)          | 9 (10)     |
| – в учреждениях лечебно-профилактического звена                                  | 9              | 11         |
| – в учреждениях лабораторно-диагностического профиля                             | 12             | 9          |

Значительный удельный вес в госветслужбе составляют ветспециалисты в возрасте до 35 лет. Это свидетельствует о том, что ветеринарная служба привлекает молодые кадры, поскольку работники этого возраста работоспособны, энергичны и обладают высоким потенциалом для повышения своего уровня квалификации и профессиональной подготовки.

Примерно равные части составляет персонал ветспециалистов (в целом по ветслужбе РФ) в возрастном промежутке до 35 лет (26%) и пенсионного возраста (25%). То есть значительная доля ветеринарных специалистов приходится также и на старшую возрастную группу. Специалисты пенсионного возраста, как правило, имеют высокий уровень квалификации, знаний, опыта, которые они продолжают применять на своих рабочих местах. В то же время высокая доля ветспециалистов пенсионного возраста в составе персонала организации может снизить восприимчивость к различного рода инновациям. Данные, приведенные исследовательским центром портала Superjob, подтверждают, что «работодатели чаще склонны видеть в сотрудниках старшего возраста положительные, а не отрицательные черты» [10]. Во многих зарубежных странах также отмечается высокий процент людей, которые продолжают трудовую деятельность после 65 лет [9, 14].

**Структура кадров по гендерному признаку.** Одним из показателей оценки трудовых ресурсов является разделение состава организации по гендерному признаку. Для ветеринарной службы этот показатель носит чисто информационный характер, так как по законодательству дополнительные льготы ветспециалистам по половому признаку не предоставляются.

В целом в государственной ветеринарной службе РФ женщины-ветспециалисты в структуре персонала занимают значительную долю – 62%, следовательно, доля мужчин составляет 38%.

Соотношение в пользу мужчин присутствует только на уровне органов управления ветеринарией субъектов РФ, где они составляют 57%, а среди сотрудников госветнадзора – 59%. На всех остальных уровнях организации ветслужбы наблюдается преобладание специалистов женского пола. Женщины явно доминируют в учреждениях лабораторно-диагностического сектора, где их доля составляет 89%. Возможно, это связано с тем, что работа в лабораториях требует большей усидчивости и скрупулезности, а эта черта более свойственна специалистам женского пола. Причиной также могут быть более комфортные условия труда по сравнению с условиями работы в хозяйствах.

**Движение трудовых ресурсов государственной ветеринарной службы.** Численность сотрудников любой организации в течение определенного времени изменяется. Это связано с приемом на работу новых сотрудников и увольнением работающих. Процесс изменения численности сотрудников представляет собой движение рабочей силы, которое характеризуется рядом показателей: коэффициентом оборота по приему кадров, коэффициентом оборота по выбытию кадров, коэффициентом полного оборота кадров, коэффициентом восполнения кадров и др. [1, 4, 6, 13].

Коэффициент оборота по приему кадров позволяет определить удельный вес принятых сотрудников к среднесписочному числу работающих сотрудников (табл. 2).

Данные таблицы свидетельствуют о том, что удельный вес принятых в течение года ветеринарных специалистов на всех уровнях организации ветеринарной службы, кроме учреждений лабораторно-диагностического профиля, составил 9%. В учреждениях лабораторно-диагностического профиля доля таких сотрудников несколько выше и составила 12% от списочного состава ветспециалистов. В среднем по госветслужбе коэффициент оборота по приему кадров в 2018 г. равен 10%.

Удельный вес выбывших за год сотрудников к среднесписочному числу работающих сотрудников позволяет определить коэффициент оборота кадров по выбытию (табл. 2).

По результатам расчета видно, что коэффициенты оборота по выбытию на разных уровнях организации ветеринарной службы РФ мало отличаются друг от друга, что говорит о том, что процесс выбытия ветспециалистов практически равномерен, то есть нет масштабного сокращения кадров ни на одном из уровней организации ветеринарной службы. В среднем по стране доля уволившихся за год ветспециалистов составила 11% от общего числа ветеринарных специалистов госветслужбы РФ. Причинами выбытия специалистов могут быть как субъективные, так и объективные факторы.

Для анализа движения кадров целесообразно рассматривать коэффициенты оборота по приему и выбытию параллельно. Из таблицы 2 видно, что как в целом по ветеринарной службе, так и на каждом из уровней ее организации данные коэффициенты невысокие и имеют несущественные различия между собой. О незначительной потере численности ветспециалистов госветнадзора и учреждений лечебно-профилактического звена говорит факт превышения коэффициента оборота по выбытию над коэффициентом оборота по приему. О положительной тенденции свидетельствует соотношение данных коэффициентов в учреждениях лабораторно-диагностического профиля, которое говорит о приросте численности специалистов на данном уровне ветеринарной службы. Это может быть следствием открытия дополнительных вакансий существующих направлений деятельности или открытием новых структурных подразделений.

Общую оценку степени изменения кадрового состава как за счет вновь принятых на работу, так и за счет уволившихся по различным причинам дает коэффициент общего оборота кадров. Он равен отношению суммы числа принятых и уволенных к среднесписочной численности сотрудников (табл. 3). Чем меньше значение данного коэффициента, тем более стабилен и постоянен должен быть состав кадров.

Сравнивая данные таблицы 3, можно сделать вывод о том, что уровень стабильности кадров на разных уровнях организации ветеринарной службы существенно не отличается между собой. Более постоянный состав ветеринарных специалистов замечен среди сотрудников органа исполнительной власти. Менее постоянный состав ветеринарных кадров – в учреждениях лабораторно-диагностического профиля. Данный факт может косвенно указывать на возможные проблемы, связанные с организацией труда, оплатой труда, социальной поддержкой ветспециалистов и т. п. Чтобы определить истинные причины, необходимо проводить более детальный анализ влияющих на данную ситуацию факторов.

Важным показателем, характеризующим движение кадров, является коэффициент восполнения (замещения) кадров, который рассчитывается как отношение числа принятых к числу уволенных специалистов за год (табл. 3).

Коэффициент восполнения характеризует процесс восполнения уволившихся из организации по различным причинам работников вновь принятыми. Для организации целесообразно, чтобы данный коэффициент был больше 1. Однако в динамике значение коэффициента восполнения кадров, близкое к 1, не всегда имеет положительную тенденцию. Он может иметь такое значение и в случае отсутствия смены персонала, которое ведет к «застою» кадров и может в будущем создать проблемы (например, «старение» кадров, если в штате большой процент сотрудников имеет предпенсионный или пенсионный возраст).

Так, коэффициент восполнения в целом по государственной ветеринарной службе в 2018 г. составил 0,91% (за год выбыло на 486 человек больше, чем принято на работу). Такая ситуация, когда коэффициент замещения меньше 1, характерна для большинства уровней организации ветеринарной службы: органа исполнительной власти в области ветеринарии, подразделения госветнадзора и учреждений лечебно-профилактического звена. Следовательно, на данных уровнях организации может иметь место нехватка персонала, увеличение количества вакантных должностей. Однако значение коэффициента восполнения меньше 1 может свидетельствовать и о сокращении должностей (ставок) в случае уменьшения задач госветслужбы.

В учреждениях лабораторно-диагностического профиля, где коэффициент восполнения составил 1,27, происходит полное возмещение убыли ветспециалистов в связи с их увольнением. Тем не менее, согласно отчетным данным, в учреждениях лабораторно-диагностического звена наблюдается недоукомплектованность ветеринарными специалистами на 12%, а в целом по госветслужбе – в среднем на 10%.

Потребность в персонале должна быть увязана с перспективами развития организации, поскольку процесс привлечения квалифицированных работников длительный. Он связан с подготовкой, переподготовкой, инвестициями, анализом внутреннего и внешнего рынка труда [8].

Обеспечение притока ветеринарных специалистов в ветеринарные службы субъектов РФ с целью устранения дефицита кадров и поддержания их на должном уровне может быть реализовано посредством процедуры целевого приема абитуриентов в вузы по специальности «ветеринария». Данный механизм реализован в 53 субъектах, что подтверждает важность

этого направления в кадровой политике. По данным ветеринарных служб субъектов РФ, за период с 2008 по 2018 г. более 2890 человек получили ветеринарное образование в вузах по целевому приему, но из них трудоустроились в учреждения государственной ветеринарной службы только порядка 1470 человек, что свидетельствует о необходимости проведения (заинтересованными структурами) более глубокой оценки эффективности целевого обучения по специальности «ветеринария». Таким образом, только около половины молодых специалистов, окончивших вузы по целевому приему по специальности «ветеринария», возвращаются в учреждения государственной ветеринарной службы. Вероятно, применяемых мер социальной поддержки на уровне субъектов РФ недостаточно. Поэтому необходимо предпринять совместные усилия региональных и федеральных властей, чтобы повысить престижность и привлекательность профессии ветеринарного врача.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ сведений, предоставленных органами исполнительной власти субъектов РФ в области ветеринарии, позволил выделить наиболее значимые показатели для оценки трудовых ресурсов в государственной ветеринарной службе на разных уровнях ее организации: образование, стаж работы, возраст, гендерный признак, движение кадрового потенциала. Анализируя значения показателей численности, структуры и движения кадров ветспециалистов в 2018 г., можно судить о том, что госветслужба РФ укомплектована ветеринарными специалистами на 90% от штатной численности. При этом число уволившихся за год ветеринарных специалистов превысило число принятых на работу, что говорит о неполном замещении в ветслужбе выбывших специалистов (коэффициент восполнения равен 0,91) и отчасти свидетельствует о незначительных негативных тенденциях на некоторых уровнях организации ветеринарной службы. Однако их значения не являются критическими, а требуют более пристального внимания для выявления явных или скрытых проблем и принятия необходимых управленческих решений в дальнейшем.

Основная масса ветспециалистов работает в учреждениях лечебно-профилактического звена (81%), что обусловлено направлением деятельности государственной ветеринарной службы. Распределение трудовых ресурсов по уровню образования показывает, что преобладают ветспециалисты с высшим образованием (75%). Характер распределения по возрастному призна-

**Таблица 3**  
**Общий оборот и восполнение ветеринарных кадров государственной ветеринарной службы РФ**

| Уровень организации госветслужбы                                                 | Коэффициент общего оборота, % | Коэффициент восполнения, % |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| Всего в госветслужбе РФ, в том числе:                                            | 21                            | 0,91                       |
| – в органе исполнительной власти субъектов РФ (из них специалисты госветнадзора) | 18 (19)                       | 0,95 (0,89)                |
| – в учреждениях лечебно-профилактического звена                                  | 20                            | 0,86                       |
| – в учреждениях лабораторно-диагностического профиля                             | 21                            | 1,27                       |

ку говорит о высокой укомплектованности ветеринарной службы специалистами в возрасте от 36 до 50 лет, которые уже обладают достаточным опытом работы и еще имеют высокий профессиональный потенциал. В структуре трудовых ресурсов госветслужбы практически равны доли молодых специалистов до 35 лет (26%) и специалистов пенсионного возраста (25%), что свидетельствует о рациональной политике в области подбора кадров. В гендерной структуре наблюдается превышение доли женщин (62%) над долей мужчин в общей численности ветеринарных специалистов государственной ветеринарной службы. Наибольший удельный вес женщин преобладает в учреждениях лабораторно-диагностического сектора (89%). Наличие в госветслужбе свыше 50% ветспециалистов с длительным стажем работы (более 10 лет) свидетельствует об укомплектованности ветеринарной службы страны опытными и квалифицированными кадрами, что играет важную роль в обеспечении эпизоотического благополучия на территории РФ.

Проведенный расчет и комплексный анализ кадровых коэффициентов дает представление о количественном, структурном, качественном состоянии штата ветеринарных специалистов, а также их движении на разных уровнях организации государственной ветеринарной службы в 2018 г. Для более глубокого анализа кадровых ресурсов необходимо проследить данные показатели в динамике за несколько лет. Это даст возможность выявить тенденцию их изменения и позволит, в случае необходимости, разработать мероприятия по совершенствованию кадровой политики в государственной ветеринарной службе РФ.

Анализ рассмотренных показателей кадрового состава госветслужбы РФ и сделанные выводы являются дополнительной информационной базой для принятия определенных управленческих решений, связанных с организацией труда и позволяющих провести более детальный анализ влияющих на конкретную ситуацию факторов, с целью обеспечения качественной работы государственной ветеринарной службы на разных уровнях ее организации.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алиев И. М., Горелов Н. А., Ильина Л. О. Экономика труда: учебник для бакалавров. – М.: Юрайт, 2013. – 671 с.
2. Анализ движения трудовых ресурсов коммерческого предприятия / Научно-популярный портал Bukvi.ru. – URL: <http://bukvi.ru/ekonomika/analiz/analiz-dvizheniya-trudovykh-resursov-kommercheskogo-predpriyatiya.html> (дата обращения: 06.08.19).
3. Артемова Я. В. Исследование отношения сотрудника к компании в контексте лояльности и стажа работы // Актуальные вопросы современной психологии: материалы Междунар. науч. конф. (г. Челябинск, 20–23 марта 2011 г.). – Челябинск: Два комсомольца, 2011. – С. 5–7.
4. Веснин В. Р. Практический менеджмент персонала: пособие по кадровой работе. – М.: Юрист, 2001. – 496 с.
5. Кадровый потенциал государственной ветеринарной службы субъектов Российской Федерации / М. А. Шибяев, И. М. Клиновикова, А. С. Оганесян [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2018. – № 4. – С. 53–62; DOI: 10.29326/2304-196X-2018-4-27-53-62.
6. Когденко В. Г. Экономический анализ. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Юнити-Дана, 2011. – 399 с.

7. Нестеров А. К. Анализ трудовых ресурсов // Энциклопедия Нестеровых. – URL: <http://odiplom.ru/lab/analiz-trudovykh-resursov.html> (дата обращения: 28.08.19).
8. Сливак В. А. Организационное поведение и управление персоналом: учебное пособие. – СПб.: Питер, 2000. – 412 с.
9. Тарлецкая Л. В. Страны ОЭСР в международной статистике труда // Мировая экономика и международные отношения. – 2010. – № 1. – С. 47–53.
10. Только 7% работодателей не обращают внимания на возраст соискателя / Исследовательский центр портала Superjob.ru. – URL: <https://www.superjob.ru/research/articles/111652/tolko-7/> (дата обращения: 30.07.19).
11. Третьякова Е. П. Оценка трудового потенциала организации // Менеджмент в России и за рубежом. – 2009. – № 1. – С. 136–144.
12. Харский К. В. Благонадежность и лояльность персонала. – СПб.: Питер, 2003. – 495 с.
13. Экономическая статистика: учебник / под ред. Ю. Н. Иванова. – 2-е изд., доп. – М.: ИНФРА-М, 2002. – 480 с.
14. FVE Survey of the veterinary profession in Europe / Federation of Veterinarians of Europe. – April 2015. – URL: [https://www.fve.org/cms/wp-content/uploads/FVE-Survey-ALL-280416\\_AMENDED-April-2016.pdf](https://www.fve.org/cms/wp-content/uploads/FVE-Survey-ALL-280416_AMENDED-April-2016.pdf) (дата обращения: 20.08.19).

## REFERENCES

1. Aliev I. M., Gorelov N. A., Ilyina L. O. Economics of Labour: textbook for bachelor students [Ekonomika truda: uchebnik dlya bakalavrov]. M.: Yurait, 2013 (in Russian).
2. Analysis of movement of human resources of a commercial establishment [Analiz dvizheniya trudovykh resursov kommercheskogo predpriyatiya]. Popular science portal – Bukvi.ru. URL: <http://bukvi.ru/ekonomika/analiz/analiz-dvizheniya-trudovykh-resursov-kommercheskogo-predpriyatiya.html> (data of access: 06.08.19) (in Russian).
3. Artemova Ya. V. Study of the employee's attitude to the company in the context of loyalty and length of service [Issledovaniye otnosheniya sotrudnika k kompanii v kontekste loylnosti i stazha raboty]. Aktual'nye voprosy sovremennoy psikhologii: materialy Mezhdunar. nauch. konf. (Chelyabinsk, March 20–23, 2011). Chelyabinsk: Dva komsomoltsa, 2011; 5–7 (in Russian).
4. Vesnin V. R. Practical personnel management: textbook for personnel management [Praktichesky menegement personala: posobiye po kadrovoy rabote]. M.: Yurist, 2001 (in Russian).
5. Human resources of the state veterinary service of the subjects of the Russian Federation [Kadrovyy potencial gosudarstvennoy veterinarnoy sluzhby subyektov Rossiyskoy Federatsii]. M. A. Shibayev, I. M. Klinovitskaya, A. S. Oganesyanyan [et al.]. Veterinary Science Today. 2018; 4: 53–62; DOI: 10.29326/2304-196X-2018-4-27-53-62.
6. Kogdenko V. G. Economic analysis [Ekonomichesky analiz]. 2<sup>nd</sup> edition, revised and enlarged. M.: Uniti-Dana, 2011 (in Russian).
7. Nesterov A. K. Analysis of human resources [Analiz trudovykh resursov]. Nesterov Encyclopedia [Enciklopediya Nesterovykh]. URL: <http://odiplom.ru/lab/analiz-trudovykh-resursov.html> (data of access: 28.08.19) (in Russian).
8. Spivak V. A. Organizational behavior and personnel management: textbook [Organizatsionnoye povedeniye i upravleniye personalom]. St. Petersburg: Piter, 2000 (in Russian).
9. Tarletskaya L. V. OECD countries in international labour statistics [Strany OESR v mezhdunarodnoy statistike truda]. Mirovaya ekonomika i mezhdunarodnye otnosheniya. 2010; 1: 47–53 (in Russian).
10. Only 7% of employers do not pay attention to employee's age [Tol'ko 7% rabotodatelej ne obrashchayut vnimaniya na vozrast soiskatelya]. Research centre of Superjob.ru portal. URL: <https://www.superjob.ru/research/articles/111652/tolko-7/> (data of access: 30.07.19) (in Russian).
11. Tretyakova E. P. Evaluation of human resources of an organization [Otsenka trudovogo potentiala organizatsii]. Management in Russia and Abroad. 2009; 1: 136–144 (in Russian).
12. Kharsky K. V. Personnel reliability and loyalty [Blagonadezhnost' i loylnost' personala]. St. Petersburg: Piter, 2003 (in Russian).
13. Economic statistics [Ekonomicheskaya statistika]: textbook. ed. by Yu. N. Ivanov. 2<sup>nd</sup> edition, enlarged edition. M.: INFRA-M, 2002 (in Russian).
14. FVE Survey of the veterinary profession in Europe. Federation of Veterinarians of Europe. April 2015. URL: [https://www.fve.org/cms/wp-content/uploads/FVE-Survey-ALL-280416\\_AMENDED-April-2016.pdf](https://www.fve.org/cms/wp-content/uploads/FVE-Survey-ALL-280416_AMENDED-April-2016.pdf) (data of access: 20.08.19).

Поступила 18.10.19

Принята в печать 13.11.19



Продовольственная и сельскохозяйственная  
организация ООН (ФАО)

## ПРЕСС-РЕЛИЗ

# СОЗДАНИЕ ЦЕНТРАЛЬНО-АЗИАТСКОЙ СЕТИ ПО ОХРАНЕ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ

ОРГАНИЗОВАННЫЕ ФАО В ТАШКЕНТЕ МЕРОПРИЯТИЯ НАПРАВЛЕННЫ НА ОКАЗАНИЕ ПОДДЕРЖКИ В БОРЬБЕ С БРУЦЕЛЛЕЗОМ И СОЗДАНИЕ ТЕХНИЧЕСКОЙ СЕТИ ПО ОХРАНЕ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ

**11 ноября 2019 года,  
Ташкент, Узбекистан**

Животноводство традиционно является основным видом деятельности для многих семей в Центральной Азии. Охрана здоровья животных позволяет избежать серьезных негативных социально-экономических последствий. Две встречи ФАО, состоявшиеся в Ташкенте в ноябре 2019 г., направлены на улучшение здоровья животных.

Учитывая трансграничный характер большинства болезней животных и заболеваний, вызываемых продуктами животного происхождения, необходимо создание платформы для регулярных встреч представителей органов по охране здоровья животных стран Центральной Азии с целью обмена информацией и обсуждений, определения приоритетов и согласования основных вопросов и совместных действий. Пришло время для создания Центрально-Азиатской сети по охране здоровья животных, подобной успешно действующим в других субрегионах, чтобы заполнить имеющийся пробел в этой сфере для Казахстана, Кыргызстана, Таджикистана, Туркменистана и Узбекистана.

Данная сеть, созданная в рамках ташкентской встречи 14–15 ноября, также позволит странам совместно определять приоритеты, выявлять проблемы и разрабатывать общий план действий для их решения. Платформа предлагает более широкие рамки для специалистов в области ветеринарной медицины, эпидемиологии, эпиднадзора и диагностики с целью формирования обширных технических знаний, компетенций и лидерских качеств, необходимых для координации действий по управлению рисками трансграничных болезней животных и зоонозов.



Фото: ©Depositphotos/paulgrecaud

В рамках сети будут обсуждаться такие вопросы, как международное регулирование животноводства, осуществление надзора и контроля за инфекционными заболеваниями, торговля и экономические последствия торговых ограничений. В долгосрочной перспективе новая сеть должна внести свой вклад в гармонизацию мер политики и подходов, улучшение обмена информацией и целенаправленное обучение кадров, а также стандартизацию лабораторных процедур и рабочих процессов.

На начальном этапе сотрудничества страны выбрали в качестве основного объекта пристального внимания региональной сети бруцеллез, поскольку заболевание является источником серьезных экономических и социальных последствий для беднейших стран.

Бруцеллез является распространенным во всем мире инфекционным заболеванием, вызываемым бактериями, которые могут передаваться людям при контакте с инфицированными животными, такими как овцы, крупный рогатый скот, козы, свиньи и собаки, или продуктами животного происхождения, такими как сырое и недоваренное мясо и непастеризованное молоко. Даже охотники подвергаются риску заражения, так как могут вдохнуть опасные бактерии при разделке дичи.

На семинаре, состоявшемся 11–13 ноября и посвященном борьбе с бруцеллезом в Центральной Азии, были представлены инструменты для осуществления последовательной борьбы с этой болезнью, что является первоочередной задачей для всех пяти стран.

«В нашем быстро меняющемся мире, где болезни животных стремительно распространяются, невзирая на границы, обмен информацией и сотрудничество между соседними странами и торговыми партнерами необходимы для предотвращения распространения эпидемий, что ведет к уменьшению их социального и экономического ущерба», – отметил эксперт ФАО по охране здоровья животных Даниэль Бельтран-Алькрудо.

На семинаре были представлены Пошаговый подход к осуществлению последовательной борьбы с бруцеллезом (SAPCB) и Инструмент по поэтапному искоренению бруцеллеза (STEB), разработанные совместно ФАО и Центрами по контролю и профилактике заболеваний США (CDC). Последний будет использоваться странами для проведения оценок, направленных на выявление пробелов и определение последующих шагов в деятельности по профилактике и борьбе с бруцеллезом в каждой из пяти стран-участниц, а также положит начало развитию региональной координационной сети.

«Пошаговый подход был успешно реализован в отношении других основных болезней животных. Кон-

троль над болезнью – масштабная задача, требующая многих лет непрерывных усилий. Поэтому сначала она кажется непосильной. Пошаговый подход, позволяющий разбить процесс на более короткие, мелкие управляемые последовательные этапы, поможет странам постепенно добиться эффективной профилактики, контроля и ликвидации бруцеллеза и одновременно отслеживать прогресс в этом направлении», – добавил Бельтран-Алькрудо.

Важно также определить базовые возможности стран в области борьбы с болезнями животных. Для этой цели каждая страна-бенефициар будет оцениваться с привлечением внешних экспертов и использованием двух дополнительных инструментов, разработанных ФАО: Инструмента оценки надзора (SET) и Инструмента картирования лабораторий (LMT).

#### ССЫЛКИ:

*Семинар по Пошаговому управлению бруцеллезом в Центральной Азии*  
[www.fao.org/europe/event/detail-events/ru/c/1242826/](http://www.fao.org/europe/event/detail-events/ru/c/1242826/)

*Создание Центрально-Азиатской сети по охране здоровья животных (CAAHN)*  
[www.fao.org/europe/event/detail-events/ru/c/1238324/](http://www.fao.org/europe/event/detail-events/ru/c/1238324/)

*Раздел об охране здоровья животных на сайте ФАО*  
[www.fao.org/animal-health/ru/](http://www.fao.org/animal-health/ru/)

*Инструмент оценки надзора ФАО (SET) (на английском языке)*  
[www.fao.org/emergencies/resources/documents/resources-detail/en/c/1129356/](http://www.fao.org/emergencies/resources/documents/resources-detail/en/c/1129356/)

*Инструмент картирования лабораторий (LMT) (на английском языке)*  
[www.fao.org/3/a-i5439e.pdf](http://www.fao.org/3/a-i5439e.pdf)

# ЗДЕСЬ МОЖЕТ БЫТЬ ВАША СТАТЬЯ!

## Журнал «Ветеринария сегодня» приглашает авторов для публикации своих научных работ

- Редакция «Ветеринарии сегодня» (<http://veterinary.arriah.ru/jour/index>) рассмотрит возможность публикации ваших научных статей на страницах журнала. Наша миссия – представление основных направлений развития ветеринарной науки, привлечение внимания мировых научных сообществ к актуальным проблемам и инновационным разработкам в области ветеринарии, формирование и развитие единого мирового научного знания.
- Мы публикуем статьи как выдающихся деятелей науки, так и молодых ученых, специалистов-практиков, работников ветеринарных учреждений для обмена опытом, обеспечения устойчивого ветеринарного благополучия и новых научных дискуссий.
- Журнал основан в 2012 г. на базе ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ВНИИЗЖ). Статьи публикуются на двух языках: русском и английском. Тематическое содержание журнала меняется в зависимости от текущих задач науки и практики. Журнал распространяется по всей территории России, а также в крупнейших мировых научных центрах.

### ЗАДАЧИ ЖУРНАЛА



Изучение основных тенденций развития ветеринарной науки



Анализ широкого круга передовых технологий в области мониторинга и эпизоотологии болезней животных, представление результатов теоретических и экспериментальных исследований в данной области



Обсуждение актуальных вопросов ветеринарии

### ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫМ СТАТЬЯМ

- К публикации принимаются статьи на двух языках – русском и английском, – содержащие результаты собственных научных исследований, объемом до 6–8 страниц (до 10 страниц – для обзора) – но не менее 5 (при одинарном интервале и размере шрифта 12). Оптимальный объем статьи: **3000–6000 слов**.

*Предоставление в редакцию рукописи статей является подтверждением согласия автора на использование его произведения как в бумажном, так и в электронном виде. Авторы несут ответственность за полноту и достоверность цитируемой в их работах литературы, а также за публикацию заимствованного материала без ссылки на источник. Материалы направляются в редакцию с сопроводительным письмом от организации автора (форма на сайте).*

### СТРУКТУРА ПРЕДСТАВЛЯЕМОЙ СТАТЬИ

1. УДК.
2. Название статьи.
3. Имя, отчество, фамилия автора.
4. Место работы автора, должность, ученая степень, адрес электронной почты, ORCID ID.
5. Резюме (краткое точное изложение содержания статьи, включающее фактические сведения и выводы описываемой работы): 200–250 слов, но не более 2000 знаков.
6. Ключевые слова (5–6 слов, словосочетаний), наиболее точно отображающие специфику статьи.
7. Введение.
8. Материалы и методы.
9. Результаты и обсуждение.
10. Выводы или заключение.
11. Список литературы (т. е. список всей использованной литературы, ссылки на которую даются в самом тексте статьи). Формат оформления в соответствии с ГОСТ Р 7.05-2008. Для статей – 10–15 источников, для обзоров – не более 25–35 источников.
12. К размещению принимаются иллюстрированные материалы (фото, картинки) хорошей контрастности, с разрешением не ниже 300 точек на дюйм (300 dpi), оригиналы прикладываются к статье отдельными файлами в формате .tif или .jpg (рисунки, не соответствующие требованиям, будут исключены из статей, поскольку достойное их воспроизведение типографским способом невозможно).

Работа должна быть представлена в редакторе WORD, формат DOC, шрифт Times New Roman, размер шрифта – 12, межстрочный интервал – одинарный, размер полей – по 2 см, отступ в начале абзаца – 1 см, форматирование по ширине.

Рисунки, таблицы, схемы, графики и пр. должны быть обязательно пронумерованы, иметь источники и «вмещаться» в печатное поле страницы. Название таблицы – над таблицей; название рисунка/графика – под рисунком/графиком.

Оригиналы и копии присланных статей не возвращаются. Авторы должны гарантировать, что поданный материал не был ранее опубликован. Важным условием для принятия статей в журнал «Ветеринария сегодня» является выполнение всех вышеперечисленных требований редакции.

### ПОДРОБНЕЕ ОБ УСЛОВИЯХ ПУБЛИКАЦИИ СТАТЕЙ ВЫ МОЖЕТЕ УЗНАТЬ В НАШЕЙ РЕДАКЦИИ

**Адрес:** 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец

**Телефоны:** +7 (4922) 26-15-12, 26-17-65, 26-19-88, доб. 22-27

**Контактное лицо:** Лаврухина Ольга Игоревна, e-mail: [lavruhina@arriah.ru](mailto:lavruhina@arriah.ru)

«Ветеринария сегодня» – это прекрасная возможность заявить о себе миру!



**ФГБУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»  
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)**

FGBI "FEDERAL CENTRE FOR ANIMAL HEALTH" (FGBI "ARRIAN")

**Региональная референтная лаборатория МЭБ по ящуру**  
OIE Regional Reference Laboratory for Foot and Mouth Disease

**Референтная лаборатория МЭБ по высокопатогенному и низкопатогенному  
гриппу птиц и ньюкаслской болезни**

The OIE Reference Laboratory for Highly Pathogenic Avian Influenza and Low Pathogenic  
Avian Influenza (Poultry) and Newcastle Disease

**ОСНОВНЫМ НАПРАВЛЕНИЕМ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ  
ИСПЫТАТЕЛЬНОГО ЦЕНТРА ФГБУ «ВНИИЗЖ»  
ЯВЛЯЕТСЯ:**

проведение независимых испытаний пищевой продукции, продовольственного сырья и кормов для животных по показателям качества и безопасности, определяющим степень соответствия их нормам и требованиям действующих Технических регламентов (ТР) Таможенного союза (ТС), ГОСТов, СанПиНа и других нормативных документов (НД) Таможенного союза и Российской Федерации.

**ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФГБУ «ВНИИЗЖ»  
ПРОВОДИТ ИСПЫТАНИЯ ПРОДУКЦИИ  
ПО СЛЕДУЮЩИМ НАПРАВЛЕНИЯМ  
(ОБЛАСТЬ АККРЕДИТАЦИИ):**

**Пищевые продукты**

**и продовольственное сырье**

1. Хлебобулочные и макаронные изделия.
2. Продукция сахарной промышленности (сахар-песок, сахар-рафинад).
3. Изделия кондитерские сахаристые.
4. Продукция винодельческой промышленности.
5. Продукция производства безалкогольных напитков.
6. Вода питьевая.
7. Мясо, субпродукты охлажденные, замороженные, мясные и растительные мясосодержащие консервы, мясные полуфабрикаты.

8. Продукция молочной и маслосыродельной промышленности.

9. Пищевая масложировая продукция.

10. Непищевая масложировая продукция (глицерин натуральный дистиллированный, мыло хозяйственное).

11. Соковая продукция из фруктов и овощей.

12. Зерно и продукты его переработки.

13. Продукты рыбной промышленности.

13. Мед, продукция пчеловодства.

14. Пищевые концентраты и крахмал.

15. Растительные масла, продукты переработки растительных масел.

16. Овощи.

**Корма**

1. Корма растительного происхождения.
2. Зерно злаковых, бобовых и масличных культур на кормовые цели.
3. Кормовые продукты перерабатывающей промышленности: жмыхи, шроты, отруби, жом сушеный.
4. Корма животного происхождения, жир кормовой.
5. Кормовые добавки минерального происхождения.
6. Комбикорма, премиксы, белково-витаминные добавки.

**По вопросам проведения исследований  
обращаться по тел. 8(4922)52-99-22**