



ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

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

VETERINARY SCIENCE TODAY

МАРТ | MARCH

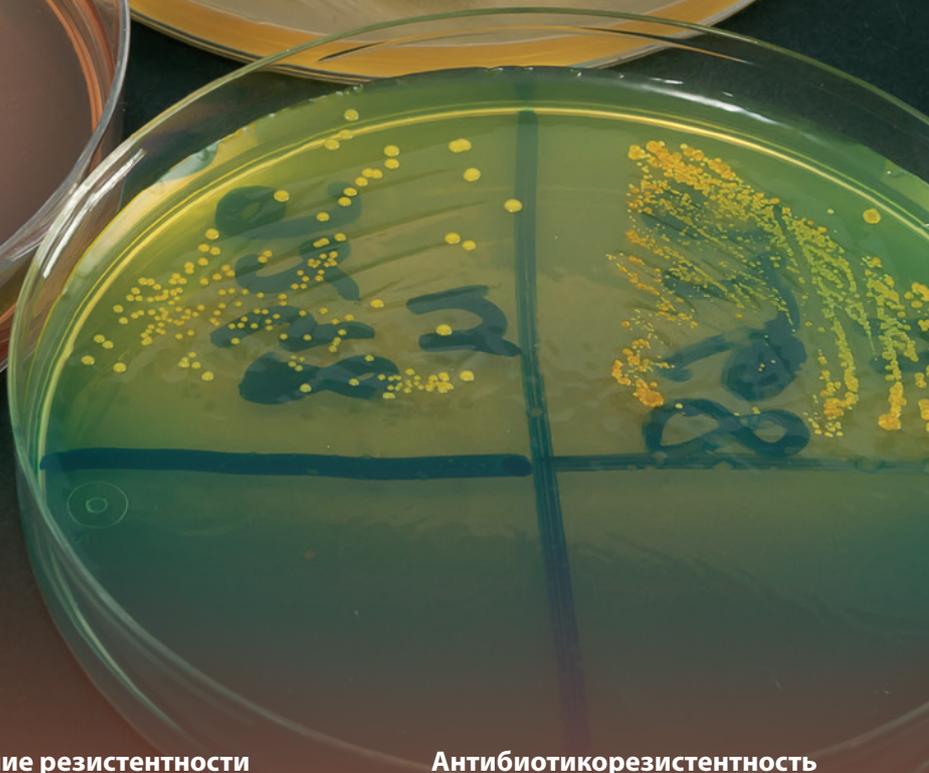
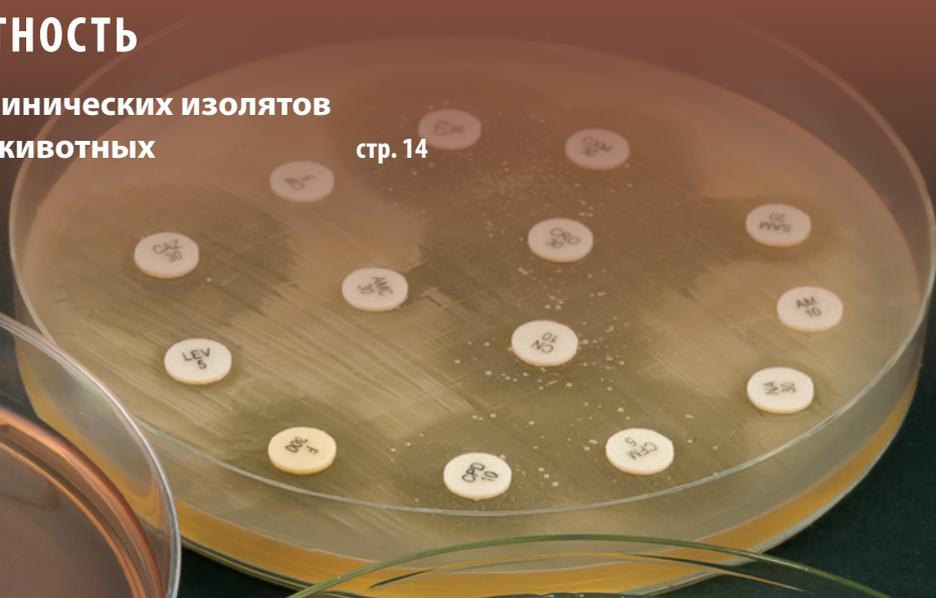
ТОМ 11 № 1 2022

SCIENTIFIC JOURNAL

АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ

Антибиотикорезистентность клинических изолятов
Escherichia coli, выделенных от животных

стр. 14



Современное представление
о механизмах антимикробной
резистентности бактерий
(аналитический обзор)

стр. 7

Изучение резистентности
патогенных и условно-патогенных
грибов к противогрибковым
препаратам

стр. 20

Антибиотикорезистентность
изолятов сальмонелл,
выделенных из продуктов
животного происхождения

стр. 27

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

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

ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

МАРТ ТОМ 11 № 1 2022

Основан в 2012 г.

VETERINARY SCIENCE TODAY

QUARTERLY SCIENTIFIC JOURNAL

MARCH VOLUME 11 No. 1 2022

Published since 2012

Журнал «Ветеринария сегодня»

включен в Перечень рецензируемых научных изданий (ВАК):

1.5.10 – Вирусология (ветеринарные науки),

4.2.3 – Инфекционные болезни и иммунология животных (ветеринарные науки)

Миссией издания является представление информации об основных направлениях развития российской и мировой ветеринарной науки и практики и привлечение внимания научной общественности к актуальным проблемам и инновационным разработкам в области ветеринарии

Главный редактор: Груздев Константин Николаевич – доктор биологических наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-3159-1969>; AuthorID: 304722; Scopus Author ID: 6506731135 e-mail: gruzdev@arriah.ru; тел.: 8 (4922) 45-37-96

Шеф-редактор: Мелано Юлия, советник Руководителя Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор), г. Москва, Россия, e-mail: j.melano@ya.ru

Выпускающий редактор: Никешина Татьяна, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: nikeshina@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-0959-5915; Тел: 8 (4922) 26-15-12, доб. 22-27

Фото на обложке: Zahara_Bogdan / iStock

Редакционная коллегия:

Болдбаатар Базарцэрэн – PhD в области ветеринарии, Институт ветеринарной медицины, г. Улан-Батор, Монголия; Scopus Author ID: 26634733300

Бучацкий Леонид Петрович – д-р биол. наук, профессор, Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев, Украина

Василевич Федор Иванович – д-р вет. наук, профессор, академик РАН, ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К. И. Скрябина», г. Москва, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-0786-5317>; AuthorID: 285556; ResearcherID: K-9491-2015

Глов Александр Гаврилович – д-р вет. наук, профессор, ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН», г. Новосибирск, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-2006-0196>; AuthorID: 236129; Scopus Author ID: 7004340265

Гринь Светлана Анатольевна – д-р биол. наук, профессор, член-корреспондент РАН, ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», г. Щелково, Россия; AuthorID: 563647

Гулюкин Михаил Иванович – д-р вет. наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, ФГБУН «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К. И. Скрябина и Я. П. Коваленко», г. Москва, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-7489-6175>; AuthorID: 112679; Scopus Author ID: 56114346900; ResearcherID: V-4640-2017

Забережный Алексей Дмитриевич – д-р биол. наук, профессор, ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», г. Щелково, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-7635-2596>; AuthorID: 91643; Scopus Author ID: 6507196549; ResearcherID: V-7959-2017

Иголкин Алексей Сергеевич – канд. вет. наук, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>

Ирза Виктор Николаевич – д-р вет. наук, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-7489-1772>

Кононов Александр Владимирович – канд. вет. наук, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-5523-3261>

Красочко Петр Альбинович – д-р вет. наук, д-р биол. наук, профессор, УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Беларусь; <https://orcid.org/0000-0002-4641-4757>; Scopus Author ID: 6504022390

Кузьмина Елена Васильевна – д-р вет. наук, Краснодарский научно-исследовательский ветеринарный институт – обособленное структурное подразделение ФГБУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии», г. Краснодар, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-4744-0823>

Ломако Юрий Васильевич – канд. вет. наук, доцент, РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышеселского», г. Минск, Беларусь; <https://orcid.org/0000-0002-9611-8286>; Scopus Author ID: 55996656700; ResearcherID: AAE-5001-2019

Макаров Владимир Владимирович – д-р биол. наук, профессор, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», г. Москва, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-8464-6380>; Scopus Author ID: 7401689971

Махамат Нгурабе Ямтитина – канд. вет. наук, Комратский государственный университет, г. Гагаузия, Молдова; <https://orcid.org/0000-0002-2738-0408>

Метлин Артем Евгеньевич – доктор ветеринарных наук, г. Вена, Австрия, e-mail: metlin@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4283-0171>; Scopus Author ID: 6505942586; ResearcherID: Z-2189-2019

Мищенко Владимир Александрович – д-р вет. наук, профессор, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-3751-2168>; Scopus Author ID: 7103128956

Мищенко Наталья Владимировна – д-р биол. наук, доцент, ФГБОУ ВО «Владимирский государственный университет им. А. Г. и Н. Г. Столетовых», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-3643-3129>; AuthorID: 66095; Scopus Author ID: 7004534956

Настасиевич Иван – PhD в области ветеринарии, Институт гигиены и технологии мяса, г. Белград, Сербия; <https://orcid.org/0000-0002-7141-269X>

Недосеков Виталий Владимирович – д-р вет. наук, профессор, Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев, Украина; <https://orcid.org/0000-0001-7581-7478>; Scopus Author ID: 57189580555

Никитин Иван Николаевич – д-р вет. наук, ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана», г. Казань, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-3981-0882>; ResearcherID: F-5330-2019

Плющиков Вадим Геннадьевич – д-р с.-х. наук, профессор, Аграрно-технологический институт, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», г. Москва, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-2057-4602>

Пронин Валерий Васильевич – д-р биол. наук, профессор, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-6240-3062>; ResearcherID: F-5330-2014

Прохватилова Лариса Борисовна – канд. биол. наук, доцент, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-9560-0724>; Scopus Author ID: 36244177300

Прунтова Ольга Владиславовна – д-р биол. наук, профессор, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-3143-7339>

Русалеев Владимир Сергеевич – д-р вет. наук, профессор, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-4972-6326>

Савченкова Ирина Петровна – д-р биол. наук, профессор, ФГБУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К. И. Скрябина и Я. П. Коваленко», г. Москва, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-3560-5045>; AuthorID: 116034; Scopus Author ID: 6506749368; ResearcherID: D-3777-2014

Самарджия Марко – PhD в области ветеринарии, профессор, Загребский университет, факультет ветеринарной медицины, г. Загреб, Хорватия; <https://orcid.org/0000-0003-0402-3173>; Scopus Author ID: 8410731800

Сидорчук Александр Андреевич – д-р вет. наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К. И. Скрябина», г. Москва, Россия; AuthorID: 508887

Сисягин Павел Николаевич – д-р вет. наук, профессор, член-корреспондент РАН, г. Нижний Новгород, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-1085-220X>

Соколович Марьяна – PhD в области ветеринарии, Хорватский ветеринарный институт, Центр птицеводства, г. Загреб, Хорватия; <https://orcid.org/0000-0003-3373-7415>

Старов Сергей Константинович – канд. вет. наук, старший научный сотрудник, заместитель главного редактора, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; AuthorID: 596191

Субботин Александр Михайлович – д-р биол. наук, профессор, Заместитель Премьер-министра Республики Беларусь, г. Минск, Беларусь; AuthorID: 4709795

Сулейманов Сулейман Мухитдинович – д-р вет. наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет им. императора Петра I», г. Воронеж, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-0461-9885>

Федотов Сергей Васильевич – д-р вет. наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К. И. Скрябина», г. Москва, Россия; AuthorID: 460625

Чвала Илья Александрович – канд. вет. наук, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>; Scopus Author ID: 57204228517

Шахов Алексей Гаврилович – д-р вет. наук, профессор, член-корреспондент РАН, ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии Россельхозакадемии», г. Воронеж, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-6177-8858>

Шкуратова Ирина Алексеевна – д-р вет. наук, профессор, член-корреспондент РАН, ФГБУ «Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения РАН», г. Екатеринбург, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-0025-3545>; AuthorID: 482688

Эрдэнэбаатар Жанчивдорж – PhD в области ветеринарии, профессор, Институт ветеринарной медицины, г. Улан-Батор, Монголия

Дизайн и верстка: Бондарь Мария
Технический редактор: Гусева Елена
Редактор-координатор: Мигулина Юлия
Редакторы-корректоры ФГБУ «ВНИИЗЖ»:
Фроловцева Анна, Нурмухамбетова-Михайлова Юлия
Корректор: Зверева Ирина
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.

Научный журнал «Ветеринария сегодня» включен в информационно-аналитическую систему РИНЦ, каталог журналов открытого доступа DOAJ, а также в список журналов, входящих в базу данных RSC на платформе Web of Science, и международную базу данных EBSCO. Электронные версии журнала размещаются в полнотекстовом формате на сайте Научной электронной библиотеки (НЭБ) eLIBRARY.RU, в каталоге DOAJ и по адресу <http://veterinary.arriah.ru/jour/index>. Зарегистрированный товарный знак, свидетельство № 514190.

Тираж 1150 экземпляров.
Цена свободная.
Подписку на научный журнал «Ветеринария сегодня» можно оформить через Агентство по подписке ООО «УралПресс Стандарт»: Подписной индекс – 83862; 127015, г. Москва, Новодмитровская ул., дом 5а, строение 4; 8 (499) 700-05-07, факс: 789-86-36 доб. 3777; e-mail: moscow@ural-press.ru

Учредитель: 600901, г. Владимир, мкр. Юрьевец, ФГБУ «ВНИИЗЖ»
Издатель: ООО «Вейнард», 129626, г. Москва, проспект Мира, д. 102, стр. 31, комн. 12
Адрес редакции: 600901, г. Владимир, мкр. Юрьевец, ФГБУ «ВНИИЗЖ»
Типография: ООО «ГРАН ПРИ», 152900, Ярославская область, г. Рыбинск, ул. Луговая, 7
Подписано в печать: 22 марта 2022 года
Дата выхода в свет: 5 апреля 2022 года

18+

Creative Commons Attribution 4.0 License



The mission of the publication 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

Editor-in-Chief: Konstantin N. Gruzdev – Dr. Sci. (Biology), Professor, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3159-1969>; AuthorID: 304722; Scopus Author ID: 6506731135; e-mail: gruzdev@arriah.ru; Tel.: +7 (4922) 45-37-96

Editorial Director: Julia Melano, Advisor to the Head of the Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance (Rosselkhozadzor), Moscow, Russia, e-mail: j.melano@ya.ru

Executive Editor: Tatiana Nikeshina, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: nikeshina@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-0959-5915; Tel.: +7 (4922) 26-15-12, ext. 22-27

Cover photo: Zahara_Bogdan / iStock

Editorial Board:

Boldbaatar Bazartseren – PhD/DVM, Institute of Veterinary Medicine, Ulan Bator, Mongolia; Scopus Author ID: 26634733300

Leonid P. Buchatsky – Dr. Sci. (Biology), Professor, Institute of Fisheries of the National Academy of Agrarian Sciences, Kyiv, Ukraine

Fyodor I. Vasilyevich – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Academician of the RAS, FSBEI HE "Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA n. a. K. I. Skryabin", Moscow, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-0786-5317>; AuthorID: 285556; ResearchID: K-9491-2015

Alexander G. Glotov – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Siberian Federal Scientific Centre of Agro-Bio Technologies of the RAS, Novosibirsk, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-2006-0196>; AuthorID: 236129; Scopus Author ID: 7004340265

Svetlana A. Grin – Dr. Sci. (Biology), Professor, Corresponding Member of the RAS, FSBI "All-Russian Research and Technological Institute of Biological Industry", Schelkovo, Russia; AuthorID: 563647

Mikhail I. Gulyukin – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Honorary Scientist of the Russian Federation, FSBSI "Federal Scientific Centre VIEV", Moscow, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-7489-6175>; AuthorID: 112679; Scopus Author ID: 56114346900; ResearcherID: V-4640-2017

Alexey D. Zaberezhny – Dr. Sci. (Biology), Professor, FSBI "All-Russian Research and Technological Institute of Biological Industry", Schelkovo, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-7635-2596>; AuthorID: 91643; Scopus Author ID: 6507196549; ResearcherID: V-7959-2017

Alexey S. Igolkin – Cand. Sci. (Veterinary Medicine), FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>

Victor N. Irza – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-7489-1772>

Alexander V. Kononov – Cand. Sci. (Veterinary Medicine), FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-5523-3261>

Petr A. Krasochko – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Dr. Sci. (Biology), Professor, EE "The Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine", Vitebsk, Belarus; <https://orcid.org/0000-0002-4641-4757>; Scopus Author ID: 6504022390

Elena V. Kuzminova – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Krasnodar Research Veterinary Institute – Detached Unit FSBS "Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine", Krasnodar, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-4744-0823>

Yuri V. Lomako – Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Associate Professor, Research Republican Unitary Enterprise the Institute of Experimental Veterinary Medicine n. a. S. N. Vysheslesky, Minsk, Belarus; <https://orcid.org/0000-0002-9611-8286>; Scopus Author ID: 55996656700; ResearcherID: AAE-5001-2019

Vladimir V. Makarov – Dr. Sci. (Biology), Professor, RUDN University, Moscow, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-8464-6380>; Scopus Author ID: 7401689971

N. Ya. Makhamat – Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Comrat State University, Gagauzia, Moldova; <https://orcid.org/0000-0002-2738-0408>

Artem Ye. Metlin – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Vienna, Austria, e-mail: metlin@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4283-0171>; Scopus Author ID: 6505942586; ResearcherID: Z-2189-2019

Vladimir A. Mischenko – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-3751-2168>; Scopus Author ID: 7103128956

Natalia V. Mischenko – Dr. Sci. (Biology), Associate Professor, Vladimir State University, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-3643-3129>; AuthorID: 66095; Scopus Author ID: 7004534956

Ivan Nastasijevic – PhD/DVM, Institute of Meat Hygiene and Technology, Belgrade, Serbia; <https://orcid.org/0000-0002-7141-269X>

Vitaly V. Nedosekov – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine; <https://orcid.org/0000-0001-7581-7478>; Scopus Author ID: 57189580555

Ivan N. Nikitin – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), FSBEI HE "Kazan state academy of veterinary medicine n. a. N. E. Bauman", Kazan, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-3981-0882>; ResearcherID: F-5330-2019

Vadim G. Plyuschikov – Dr. Sci. (Agricultural Science), Professor, Agrarian and Technological Institute, RUDN University, Moscow, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-2057-4602>

Valery V. Pronin – Dr. Sci. (Biology), Professor, FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-6240-3062>; ResearcherID: C-3433-2014

Larisa B. Prokhvatilova – Cand. Sci. (Biology), Associate Professor, FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-9560-0724>; Scopus Author ID: 36244177300

Olga V. Pruntova – Dr. Sci. (Biology), Professor, FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-3143-7339>

Vladimir S. Russaleyev – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-4972-6326>

Irina P. Savchenkova – Dr. Sci. (Biology), Professor, FSBSI "Federal Scientific Centre VIEV", Moscow, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-3560-5045>; AuthorID: 116034; Scopus Author ID: 6506749368; ResearcherID: D-3777-2014

Marko Samardžija – PhD/DVM, Professor, University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb, Croatia; <https://orcid.org/0000-0003-0402-3173>; Scopus Author ID: 8410731800

Alexander A. Sidorchuk – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, FSBEI HE "Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA n. a. K. I. Skryabin", Moscow, Russia; AuthorID: 508887

Pavel N. Sisyagin – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Associate Member of the Russian Academy of Sciences, Nizhny Novgorod, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-1085-220X>

Marijana Sokolovic – PhD/DVM, Croatian Veterinary Institute, Poultry Centre, Zagreb, Croatia; <https://orcid.org/0000-0003-3373-7415>

Sergey K. Starov – Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Deputy Editor-in-Chief, FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; AuthorID: 596191

Alexander M. Subbotin – Dr. Sci. (Biology), Professor, Deputy Prime Minister of the Republic of Belarus, Minsk, Belarus; AuthorID: 4709795

Suleiman M. Suleymanov – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Honorary Scientist of the Russian Federation, Voronezh State Agrarian University n. a. Emperor Peter the Great, Voronezh, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-0461-9885>

Sergey V. Fedotov – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, FSBEI HE "Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA n. a. K. I. Skryabin", Moscow, Russia; AuthorID: 460625

Ilya A. Chvala – Cand. Sci. (Veterinary Medicine), FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>; Scopus Author ID: 57204228517

Alexey G. Shakhov – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, RAS Associate Member, SSI "All-Russian veterinary research institute of pathology, pharmacology and therapy of the RAAS", Voronezh, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-6177-8858>

Irina A. Shkuratova – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Associate Member of the Russian Academy of Sciences, FSBSI Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre, Ural Branch of RAS", Yekaterinburg, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-0025-3545>; AuthorID: 482688

Erdenebaatar Janchivdorj – PhD/DVM, Professor, Institute of Veterinary Medicine, Ulan Bator, Mongolia

Design and composition: Maria Bondar

Technical editor: Elena Guseva

Coordinating Editor: Julia Migulina

Content editors of FGBI "ARRIAH":

Anna Frolovtseva, Julia Nurmukhambetova-Mikhailova

Proof-reader: Irina Zvereva

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.

Scientific Journal "Veterinary Science Today" is included in the information analysis system – Russian Science Citation Index, Directory of Open Access Journals DOAJ, as well as in the Web of Science RSCI database and in the international database of EBSCO. 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.

Circulation: 1150. Price: unregulated Veterinary Science Today Journal can be subscribed through the Ural-Press subscription agency: Subscription code – 83862; 127015, Moscow, Novodimitrovskaya str., 5a, str. 4; +7 (499) 700-05-07, fax: 789-86-36 add. 3777; e-mail: moscow@ural-press.ru

Establisher: 600901, Vladimir, Yur'evets, FGBI "ARRIAH"

Publisher: 000 "Veinard", 129626, Moscow, 102 Prospect Mira, bld. 31, office 12

Editorial Board Office: 600901, Vladimir, Yur'evets, FGBI "ARRIAH"

Printing Office: 000 "Grand Prix", 152900, Yaroslavl Oblast, Rybinsk, Lugovaya str., 7 Approved for print: March 22, 2022 Issued: April 05, 2022

Creative Commons Attribution 4.0 License



18+

Содержание

ОБЗОРЫ | ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

- 7** Современное представление о механизмах антимикробной резистентности бактерий (аналитический обзор)
О. В. Прунтова, В. С. Русалеев, Н. Б. Шадрова

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

- 14** Антибиотикорезистентность клинических изолятов *Escherichia coli*, выделенных от животных
М. Н. Исакова, О. В. Соколова, Н. А. Безбородова, А. С. Кривоногова, А. Г. Исаева, В. Д. Зубарева
- 20** Изучение резистентности патогенных и условно-патогенных грибов к противогрибковым препаратам
А. Д. Козлова, С. П. Яцентюк, В. В. Соколов, М. Г. Маноян
- 27** Антибиотикорезистентность изолятов сальмонелл, выделенных из продуктов животного происхождения
Н. Б. Шадрова, О. В. Прунтова, Е. А. Корчагина
- 35** Изучение формирования биопленок культурой *Pseudomonas aeruginosa* при различных режимах культивирования
Т. Е. Миронова, В. С. Черепушкина, В. Н. Афонюшкин, Н. В. Давыдова, В. Ю. Коптев, А. С. Димова
- 42** Бактериология и патологическая анатомия пневмоний у обезьян
В. А. Калашникова, Н. С. Руденко

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БОЛЕЗНИ КРС

- 49** Применение реакции иммунодиффузии как один из способов послеполовой диагностики лейкоза крупного рогатого скота
А. Р. Мустафаев
- 53** Сравнительная характеристика кишечного микробиома местного крупного рогатого скота и скота абердин-ангусской породы, импортированного в Казахстан
А. Т. Даугалиева, С. Т. Даугалиева, М. А. Кинеев, Б. С. Арынгазиев, А. И. Сембаева, Т. А. Лаврентьева

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БОЛЕЗНИ МРС

- 61** Эпизоотическая ситуация по оспе овец и оспе коз в Таджикистане в 2000–2021 гг.
Р. А. Атовуллозода

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БОЛЕЗНИ ПТИЦ

- 70** Изучение иммунного ответа цыплят после экспериментального заражения изолятами вируса гриппа птиц А/Н9N2
О. С. Осипова, М. А. Волкова, С. В. Фролов, Д. Б. Андрейчук, И. А. Чвала
- 77** Вирус инфекционной бурсальной болезни: выявление новой генетической группы и реассортантов
Л. О. Щербакова, Е. В. Овчинникова, Т. Н. Зыбина, С. Н. Колосов, Н. Г. Зиняков, З. Б. Никонова, Д. Б. Андрейчук, И. А. Чвала

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | ОБЩИЕ ВОПРОСЫ

- 85** Актуальные аспекты обеспечения биологической безопасности при сжигании биологических отходов животного происхождения в Российской Федерации
А. В. Бельчихина, М. А. Шibaев, А. М. Селянин, А. К. Караулов

Contents

REVIEWS | VETERINARY MICROBIOLOGY

- 7** Current understanding of antimicrobial resistance mechanisms in bacteria (analytical review)
O. V. Pruntova, V. S. Russaleyev, N. B. Shadrova

ORIGINAL ARTICLES | VETERINARY MICROBIOLOGY

- 14** Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolates obtained from animals
M. N. Isakova, O. V. Sokolova, N. A. Bezborodova, A. S. Krivonogova, A. G. Isaeva, V. D. Zubareva
- 20** Study of resistance of pathogenic and opportunistic fungi to antimycotics
A. D. Kozlova, S. P. Yatsentyuk, V. V. Sokolov, M. G. Manoyan
- 27** Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates recovered from animal products
N. B. Shadrova, O. V. Pruntova, E. A. Korchagina
- 35** Studying formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown under different cultivation conditions
T. E. Mironova, V. S. Cherepushkina, V. N. Afonyushkin, N. V. Davydova, V. Yu. Koptev, A. S. Dimova
- 42** Bacteriology and pathological anatomy of pneumonias in monkeys
V. A. Kalashnikova, N. S. Rudenko

ORIGINAL ARTICLES | BOVINE DISEASES

- 49** Immunodiffusion assay as a method of bovine leukosis post-mortem diagnosis
A. R. Mustafayev
- 53** Comparative analysis of intestinal microbiome of local cattle and Aberdeen Angus cattle imported to Kazakhstan
A. T. Daugaliyeva, S. T. Daugaliyeva, M. A. Kineev, B. S. Aryngazyev, A. I. Sembaeva, T. A. Lavrentieva

ORIGINAL ARTICLES | SMALL RUMINANTS DISEASES

- 61** Epizootic situation on sheep pox and goat pox in Tajikistan in 2000–2021
R. Atovullozoda

ORIGINAL ARTICLES | AVIAN DISEASES

- 70** Testing of chickens experimentally infected with A/H9N2 avian influenza virus isolates for their immune responses
O. S. Osipova, M. A. Volkova, S. V. Frolov, D. B. Andreychuk, I. A. Chvala
- 77** Infectious bursal disease virus: identification of the novel genetic group and reassortant viruses
L. O. Scherbakova, Ye. V. Ovchinnikova, T. N. Zybina, S. N. Kolosov, N. G. Zinyakov, Z. B. Nikonova, D. B. Andreychuk, I. A. Chvala

ORIGINAL ARTICLES | GENERAL ISSUES

- 85** Contemporary issues in ensuring biological safety during disposal of biological wastes of animal origin by incineration in the Russian Federation
A. V. Belchikhina, M. A. Shibayev, A. M. Selyanin, A. K. Karaulov

Поздравление директора ФГБУ «ВНИИЗЖ» с 10-летием журнала «Ветеринария сегодня»

Уважаемые читатели, прошло 10 лет со дня основания ежеквартального научного журнала «Ветеринария сегодня», учредителем которого является ФГБУ «ВНИИЗЖ». Отправной точкой в его истории мы считаем 21 марта 2012 г. Создание журнала пришлось на активную фазу заноса экзотических болезней на территорию нашей страны. Нужно было новое издание, которое бы стало главным источником информации о достижениях науки и внедрении результатов в ветеринарную практику. Цели, поставленные тогда первой редакционной коллегией, были достигнуты, но и сегодня они не теряют своей актуальности. В условиях изменившихся геополитических реалий роль журнала должна возрастать.

За 10 лет журнал вырос до серьезного издания, публикующего на своих страницах материалы на актуальные темы, затрагивающие все стороны развития российской и мировой ветеринарной науки и практики.

С 2015 г. журнал «Ветеринария сегодня» входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и на соискание ученой степени доктора наук. Начиная с первого номера 2018 г. статьям журнала присваивается цифровой идентификатор объекта (DOI), все публикации переводятся на английский язык и вносятся в базу данных Crossref. В 2019 г. для онлайн-версии журнала получен международный стандартный серийный номер (ISSN), идентифицирующий периодическое печатное или цифровое издание независимо от языка или носителя.

Научный журнал включен в каталог журналов открытого доступа DOAJ, а также в список журналов, входящих в базу данных Russian Science Citation Index на платформе Web of Science, и международную базу данных на платформе EBSCOhost. Электронные версии журнала размещаются в полнотекстовом формате на сайте Научной электронной библиотеки e-LIBRARY.RU.

За время своего существования в журнале опубликованы оригинальные завершённые фундаментальные и прикладные научные работы в области общей и ветеринарной вирусологии, бактериологии, иммунологии, микологии, микотоксикологии, эпизоотологии, обзорные статьи, рецензии и информационные сообщения о российских и международных научно-практических мероприятиях.



Издание качественного полноцветного периодического журнала – дело, безусловно, тяжелое и кропотливое, но редакция с ним успешно справляется!

Уважаемые сотрудники редакции, примите мои искренние поздравления с юбилеем и пожелания успехов, дальнейшего развития на благо ветеринарии. Желаю оставаться и дальше надежным источником информации, сохранять свою популярность и высокий авторитет у читателей. Новых успешных проектов!

С уважением,
директор ФГБУ «ВНИИЗЖ»
Петр Иванович Косырев



Современное представление о механизмах антимикробной резистентности бактерий (аналитический обзор)

О. В. Прунтова¹, В. С. Русалеев², Н. Б. Шадрова³

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0003-3143-7339>, e-mail: pruntova@arriah.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-4972-6326>, e-mail: rusaleev@arriah.ru

³ <https://orcid.org/0000-0001-7510-1269>, e-mail: shadrova@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Проведен анализ и обобщены сведения о механизмах резистентности к антимикробным препаратам у бактерий. Рассмотрены основные причины возникновения и распространения устойчивости у бактерий. Охарактеризовано действие механизмов естественной резистентности патогенных бактерий (неспецифические эффлюксные насосы, инактивирующие антибиотики ферменты и механизмы, которые служат барьерами проницаемости). Описаны механизмы приобретенной устойчивости: модификация или разложение антибиотика; активное выведение антимикробного препарата из бактериальной клетки – эффлюкс (отток), секвестрация, модификация мишени (байпас). Показана дискуссионность вопроса о происхождении механизмов устойчивости к антибиотикам у патогенных бактерий. Отмечено, что прямая передача генов устойчивости к антимикробным препаратам может происходить от микроорганизмов-продуцентов к патогенным бактериям, но достоверная связь между этим процессом и распространением антимикробной резистентности в настоящее время не выявлена и не доказана. Роль горизонтальной передачи генов, включающей трансформацию свободной ДНК, трансдукцию бактериофагами и конъюгацию с участием плазмид, считают важной в распространении антимикробной резистентности. Все три механизма широко распространены в природе, хотя некоторые виды бактерий используют один механизм в большей степени, чем два других. Полагают, что трансдукция играет важную роль, в частности, в переносе генов устойчивости к антибиотикам, но до настоящего времени нет ясности в вопросе о значении трансформации или трансдукции в переносе генов резистентности в условиях лаборатории или в окружающей среде из-за сложности обнаружения рекомбинаций, возникших в естественных условиях. Представлены данные о роли конъюгации в распространении генов антимикробной резистентности в природе, в частности генов устойчивости к карбапенемам и хинолонам у грамотрицательных и грамположительных бактерий. Отмечены новые тенденции в распространении генов антимикробной резистентности.

Ключевые слова: обзор, антимикробная резистентность, антимикробный препарат, механизмы антимикробной резистентности, бактерии, микроорганизмы

Для цитирования: Прунтова О. В., Русалеев В. С., Шадрова Н. Б. Современное представление о механизмах антимикробной резистентности бактерий (аналитический обзор). *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (1): 7–13. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-7-13.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Прунтова Ольга Владиславовна, доктор биологических наук, профессор, главный эксперт информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьеvec, e-mail: pruntova@arriah.ru.

Current understanding of antimicrobial resistance mechanisms in bacteria (analytical review)

O. V. Pruntova¹, V. S. Russaleyev², N. B. Shadrova³

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ <https://orcid.org/0000-0003-3143-7339>, e-mail: pruntova@arriah.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-4972-6326>, e-mail: rusaleev@arriah.ru

³ <https://orcid.org/0000-0001-7510-1269>, e-mail: shadrova@arriah.ru

SUMMARY

Data on mechanisms of resistance to antimicrobials in bacteria are reviewed and summarized. Main causes of resistance emergence and spread in bacteria are analyzed. Mechanisms of innate resistance of pathogenic bacteria (non-specific efflux pumps, antibiotic-inactivating enzymes and mechanisms serving as permeability barriers) are characterized. Mechanisms of acquired resistance are described: antibiotic modification or degradation; active removal of an antimicrobial from a bacterial cell – efflux (draining out); sequestration; target modification (bypass). The origin of antimicrobial resistance mechanisms in pathogenic bacteria is shown to be debatable. It is noted that producer microorganisms can directly transfer antimicrobial resistance genes to pathogenic bacteria, but a reliable link

between this process and antimicrobial resistance spread has not been identified and proven so far. Horizontal gene transfer, including free DNA transformation, transduction by bacteriophages and plasmid-involving conjugation, is believed to play an important role in antimicrobial resistance spread. All three mechanisms are widespread in nature, although some bacterial species use one mechanism to a great extent than the other two. Transduction is supposed to play an important role, in particular, in the antibiotic resistance gene transfer, but the significance of transformation or transduction in the resistance gene transfer under the laboratory or environmental conditions has not been clarified so far due to the difficulty of naturally emerging recombination detection. Data on the role of conjugation in the antimicrobial resistance gene spread in nature, in particular carbapenem- and quinolone-resistance genes in gram-negative and gram-positive bacteria are presented. New trends in the antimicrobial resistance gene spread are indicated.

Keywords: review, antimicrobial resistance, antibiotics, mechanisms of antimicrobial resistance, bacteria, microorganisms

For citation: Pruntova O. V., Russaleyev V. S., Shadrova N. B. Current understanding of antimicrobial resistance mechanisms in bacteria (analytical review). *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (1): 7–13. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-7-13.

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

For correspondence: Olga V. Pruntova, Doctor of Science (Biology), Professor, Chief Expert, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: pruntova@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Антимикробная резистентность (АМР) – устойчивость бактерий к антимикробным препаратам (АМП) – на сегодняшний день является одной из серьезнейших глобальных проблем во всем мире. Длительное использование антибиотиков для борьбы с возбудителями болезней животных и человека привело к тому, что некоторые бактерии стали устойчивы к лекарствам, а заболевания перестали поддаваться лечению. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), уже сегодня многие инфекции вызваны патогенными микроорганизмами, устойчивыми к противомикробным лекарственным препаратам [1, 2].

Появление и широкое распространение антибиотикорезистентных форм бактерий, нечувствительных ко многим АМП, сопровождается снижением эффективности терапии, увеличением сроков лечения и повышением летальности. Все это диктует необходимость мониторинга возбудителей бактериозов животных, их структуры и уровня лекарственной резистентности, а эмпирическая антибиотикотерапия болезни, практикуемая в настоящее время ветеринарными специалистами, должна учитывать фактические данные эпизоотологического мониторинга антибиотикорезистентности бактерий, циркулирующих в конкретных животноводческих хозяйствах.

Данная проблема из-за сложности и комплексности вышла за рамки компетенции только ВОЗ и Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ). Сегодня признано, что ни одна страна или организация не может самостоятельно справиться с вопросами резистентности к АМП [3, 4].

Решение проблемы АМР необходимо начинать с разработки стратегии по ее предотвращению и сдерживанию, которая должна включать в себя несколько направлений. Ключевым из которых является проведение мероприятий, направленных на ограничение и рациональное использование АМП, основанное на владении широким кругом ветеринарных специалистов знаний о механизмах антимикробной резистентности бактерий.

Российская Федерация участвовала в разработке резолюции по глобальной стратегии и плана действий по борьбе с АМР, принятых ассамблеей ВОЗ в 2015 г. Введение в действие этой резолюции обязывает все

страны проводить мониторинг лекарственно-устойчивых бактериальных инфекций и обеспечивать контроль за применением АМП в ветеринарии, медицине и сельском хозяйстве, а также укреплять международное сотрудничество и финансирование в данной сфере. Кроме того, международные организации взяли на себя обязательства ужесточить законодательное регулирование применения АМП, заняться поиском рационального их использования (совершенствование лабораторной диагностики бактериозов с учетом их чувствительности к АМП) и широко внедрять меры профилактики инфекционных заболеваний, включая вакцинацию, очистку воды, санитарно-гигиенические мероприятия [5].

В сентябре 2017 г. Правительство Российской Федерации утвердило разработанную Минздравом России «Стратегию предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года» [6], которая определяет задачи по сдерживанию биологической угрозы, связанной с распространением АМР, и направлена на предупреждение и ограничение распространения устойчивости микроорганизмов к АМП.

В связи с актуальностью проблемы целью данной работы является анализ отечественной и зарубежной литературы, а также обсуждение вопроса о механизмах возникновения и распространения антимикробной резистентности бактерий.

ОСНОВНЫЕ ПРИЧИНЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ И РАСПРОСТРАНЕНИЯ АМР У БАКТЕРИЙ

Фенотипическое проявление АМР бактерий опосредовано генетическими свойствами, но не все генетические детерминанты резистентности и не всегда проявляются фенотипически. Причина возникновения и распространения резистентности бактерий к АМП происходит вследствие:

- появления в их генах *случайных мутаций*, которые могут, например, изменять спектр активности бактериальных ферментов, расщепляющих антибиотики;
- *обмена генетическим материалом между клетками*, то есть переноса генов от устойчивых к менее устойчивым или чувствительным микроорганизмам посредством переноса хромосом, плазмид, фагов, транслоцирующих элементов;

– селекции новых резистентных штаммов под действием избирательного давления АМП, связанного с бесконтрольностью их применения в разных сферах [7].

Традиционно механизмы АМП рассматриваются только в отношении патогенных микроорганизмов, которые вынуждены защищаться от воздействия лекарственных и дезинфицирующих препаратов. И, соответственно, основными причинами развития АМП считают антропогенное воздействие на микроорганизмы. Но в условиях окружающей среды источником генетических детерминант АМП являются в первую очередь не патогенные микроорганизмы, а микроорганизмы – продуценты антибиотиков, которые вынуждены защищаться от продуктов своей жизнедеятельности [8].

Микроорганизмы – продуценты антибиотиков имеют, как правило, не один, а множество сложных механизмов самозащиты, обеспечивающих полную защиту от производимых ими биологически активных молекул. Более того, некоторыми исследователями показано, что генетические детерминанты саморезистентности почти всегда сгруппированы с генами биосинтеза антибиотиков и их экспрессия регулируется совместно [9]. Поэтому для полного понимания развития устойчивости у патогенных микроорганизмов к антибиотикам необходимо помимо часто упоминаемых причин АМП учитывать и естественные резервуары генов устойчивости, которые могут включать детерминанты, которые определяют саморезистентность микроорганизмов, продуцирующих антибиотики. Несмотря на то что эти детерминанты устойчивости у представителей микрофлоры окружающей среды не представляют угрозы для здоровья животных, передача этих детерминант плазмидам и интеграммам в патогенные бактерии в дальнейшем может привести к увеличению количества таких детерминант в популяциях патогенных бактерий и возникновению проблем огромных масштабов. То есть для предупреждения распространения АМП необходимо изучать и контролировать распределение детерминант резистентности в бактериальных популяциях, выяснять механизмы устойчивости и определять факторы окружающей среды, которые способствуют их распространению [8].

МЕХАНИЗМЫ АМП ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Как уже было сказано выше, микроорганизмы обладают естественной и приобретенной АМП. К механизмам естественной резистентности относятся неспецифические эффлюксные помпы (которые, вероятно, возникли как общий ответ на токсины окружающей среды), ферменты, инактивирующие антибиотики, и механизмы, которые служат барьерами проницаемости [10, 11]. Эти механизмы кодируются в основной генетической структуре – хромосоме бактериальной клетки. Примером естественной АМП является хорошо изученная система эффлюксного оттока AcrAB-TolC у *Escherichia coli*, которая имеет очень широкую субстратную специфичность и может выводить различные классы антибиотиков и дезинфицирующих средств [12]. Устойчивость к ванкомицину у *E. coli* и других грамотрицательных бактерий также является известным примером естественной резистентности, которая возникает из-за барьера проницаемости, создаваемого внешней мембраной [13]. Несмотря на то что естественные механизмы АМП обеспечивают низкий уровень устойчивости к антибиотикам, необхо-

димо учитывать, что нормальная комменсальная микрофлора животных или бактерии объектов окружающей среды (водоемов, пастбищ), которые обладают естественными механизмами резистентности, могут стать условно-патогенными микроорганизмами у животных с ослабленным иммунитетом [14]. С другой стороны, механизмы приобретенной устойчивости у бактерий обычно появляются в результате горизонтального переноса генов и включают еще и специфические эффлюксные насосы, кодируемые плазмидой, например, такие как TetK и TetL у *Staphylococcus aureus*, а также ферменты, которые могут модифицировать антибиотик или мишень антибиотика [15, 16]. Данные механизмы представляют более серьезную угрозу для здоровья человека и животных из-за транслокации детерминант АМП с хромосомы на плазмиду, потому что это приводит к их усиленной экспрессии и распространению. Таким примером является перемещение хромосомного гена β -лактамазы AmpC в плазмиду, что привело к его распространению по всему миру [17].

МЕХАНИЗМЫ ПРИОБРЕТЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ У ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Биохимические механизмы устойчивости патогенных бактерий очень похожи на механизмы, обнаруженные у микроорганизмов-продуцентов. Более того, гены АМП патогенных бактерий принадлежат к тем же функциональным семействам, что и у микроорганизмов-продуцентов. Биохимические механизмы АМП подразделяют на несколько групп: модификация или разложение антибиотика; активное выведение АМП из бактериальной клетки (эффлюкс, отток); секвестрация АМП; модификация мишени, или байпас [18, 19].

МЕХАНИЗМ МОДИФИКАЦИИ/ДЕГРАДАЦИИ АНТИБИОТИКА

Данный механизм обычно используется патогенными видами бактерий для устойчивости к аминогликозидам. Цель модификации АМП – сделать его неэффективным, особенно в случае аминогликозидных антибиотиков (например, канамицина, гентамицина и стрептомицина), хлорамфеникола и β -лактамов. Большое количество аминогликозид-модифицирующих ферментов, включая *N*-ацетилтрансферазы, *O*-фосфотрансферазы и *O*-аденилтрансферазы, которые соответственно ацетилируют, фосфорилируют или аденилируют аминогликозидный антибиотик, выявлено у бактерий-продуцентов. Впервые эти ферменты были идентифицированы у представителей рода *Streptomyces* в начале 1970-х гг., а затем выявлены у патогенных бактерий других видов, устойчивых к антибиотикам [20].

Гены, кодирующие ферменты модификации и деградации АМП, обычно расположены на мобильных генетических элементах (mobile genetic elements, MGE) у патогенных бактерий, а у большинства непатогенных бактерий окружающей среды, включая представителей родов *Providencia* и *Acinetobacter*, были обнаружены и хромосомные детерминанты [20]. Эти бактерии считают источником приобретенных детерминант АМП, обнаруженных на MGE у патогенных штаммов. Из известных ферментов, модифицирующих аминогликозиды, наиболее распространенными и изученными у патогенных бактерий являются аминогликозид-*N*-ацетилтрансферазы. Кроме того, было показано, что несколько ферментов

деградации были идентифицированы как у грамположительных, так и у грамотрицательных бактерий [21]. Но наиболее распространенными ферментами модификации/деградации, используемыми патогенными бактериями, являются β -лактамазы. Хотя их роль в жизнедеятельности бактерий-продуцентов все еще остается спорной, известно, что они имеют решающее значение в устойчивости к β -лактамам у грамотрицательных бактерий. У грамположительных бактерий главную роль в механизме модификации/деградации антибиотиков играют пенициллин-связывающие ферменты и β -лактамазы, вероятно, из-за различий в структуре их клеточных стенок. У патогенных изолятов многих видов бактерий идентифицировано более 1000 β -лактамаз, и их количество продолжает увеличиваться из-за постоянно возникающих новых мутаций, позволяющих им адаптироваться к новым β -лактамам. Все известные в настоящее время β -лактамазы делятся на 4 молекулярных класса, в пределах которых ферменты характеризуются общностью свойств и определенной аминокислотной гомологией [22]. Большинство клинически значимых β -лактамаз принадлежат к классам А и С. В частности, класс А включает β -лактамазы *Klebsiella* spp., *Citrobacter diversus*, *Proteus vulgaris* и большинства *Bacteroides* spp., которые кодируются генами хромосомы, а также практически все плазмидные β -лактамазы.

Ферменты класса В относятся к металлоэнзимам, поскольку в качестве кофермента в них присутствует атом цинка, они широко распространены в плазидах представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Представители этой группы эффективны в отношении пенициллинов, цефалоспоринов и карбапенемов. Для клинической практики имеют значение β -лактамазы нескольких групп: β -лактамазы расширенного спектра грамотрицательных бактерий, цефалоспорины грамотрицательных бактерий, металл- β -лактамазы грамотрицательных бактерий [23]. В качестве примера можно привести β -лактамазу TEM-3, которая помещена в категорию β -лактамаз расширенного спектра и может разрушать цефалоспорины 3-го поколения [24], что свидетельствует о быстрой эволюции генов β -лактамаз у патогенных бактерий. Большинство генов β -лактамаз транслоцируются на MGE, что способствует их быстрому распространению в популяциях; но некоторые гены β -лактамаз могут находиться в хромосомах, например, у представителей семейства *Enterobacteriaceae*, где они почти не экспрессируются и представляют собой молчащие гены. Можно предположить, что, как и в случае с ферментами, модифицирующими аминогликозиды, β -лактамазы также могут выполнять двойную функцию, включая обеспечение внутриклеточных потребностей бактерий и устойчивость к антибиотикам [25]. Кроме того, предполагают, что биологическая функция β -лактамаз в бактериальной клетке может заключаться в восстановлении пептидогликана клеточной стенки, но при транслокации их генов в плазмиду происходит их гиперэкспрессия, что приводит к высокой устойчивости к антибиотикам [17].

АКТИВНОЕ ВЫВЕДЕНИЕ АНТИБИОТИКА ИЗ МИКРОБНОЙ КЛЕТКИ (ЭФФЛЮКС, ОТТОК)

Широко распространенным механизмом устойчивости грамположительных и грамотрицательных бактерий к различным АМП, таким как β -лактамы, фторхинолоны, макролиды, линкозамиды, тетрациклины, является

эффлюкс. Этот механизм реализуется различными системами. Первой из них является *нарушение проницаемости оболочки микробной клетки*, этот механизм распространен в основном среди грамотрицательных бактерий, обладающих внешней мембраной, и является наименее специфичным в отношении АМП разных групп. Второй системой активного выведения антибиотика из микробной клетки является *снижение проницаемости и/или оттока антибиотика из бактериальной клетки*. Снижение проницаемости имеет большое значение для грамотрицательных бактерий из-за наличия внешней мембраны, которая образует барьер проницаемости и обеспечивает внутренний механизм защиты от гидрофильных антибиотиков и других антимикробных агентов, таких как ванкомицин [12]. Было показано, что мутации в генах *porina* и изменение их экспрессии дополнительно влияют на восприимчивость грамотрицательных бактерий к гидрофильным антибиотикам [26].

Кроме этих двух механизмов было описано много типов активных эффлюксных насосов как у грамположительных, так и у грамотрицательных бактерий, работу которых обеспечивают белки-транспортёры. Обычно транспортные белки осуществляют импорт или экспорт только одного определенного субстрата. Но в естественных микробных сообществах были обнаружены мультилекарственные или полиспецифические экспортёры, и это позволило предположить, что полиспецифичность широко распространена в естественных микробных сообществах и имеет древнее происхождение [27].

Гены, кодирующие эффлюксные насосы, могут быть как естественными (природными), так и приобретенными. Примеры естественных генов включают *AcrAB-ToIC* у *E. coli*, *NorA* у *St. aureus* и *LmrA* у *Lactococcus lactis*. Из них наиболее изученной системой является трехкомпонентный насос RND *AcrAB-ToIC*. Хотя эта система осуществляет отток очень широкого спектра соединений, ее биологическая функция, как полагают, заключается в экспорте солей желчных кислот у представителей семейства *Enterobacteriaceae* [28]. Приобретенные детерминанты оттока АМП, часто обнаруживаемые на MGE у патогенных бактерий, представлены многими различными типами генов *Tet* (идентифицировано около 22), расположенных на плазидах как у грамотрицательных, так и у грамположительных бактерий [29].

СЕКВЕСТРАЦИЯ АМП

Секвестрация включает функцию белков, связывающих АМП и не позволяющих ему достичь своей цели. Этот механизм в большей степени характерен для микроорганизмов-продуцентов, например, продуцентов блеомицина – представителей видов *Streptoalloteichus hindustanus*, *Streptomyces verticillus* и *Streptomyces flavoviridis*, у которых первичный механизм устойчивости включает секвестрацию связанного с металлами или не содержащего металлов антибиотика [30].

МОДИФИКАЦИЯ МИШЕНИ ДЕЙСТВИЯ, БАЙПАС

Этот механизм обеспечивает выработку дополнительных мишеней или субъединиц у АМП, которые предотвращают его связывание, например, метилирование [18, 19]. Модификация мишени действует как механизм саморезистентности к нескольким классам антибиотиков, включая β -лактамы, гликопептиды, ма-

кролиды, линкозамиды, стрептограмин и аминогликозиды. Большое количество этих механизмов обнаружено у патогенных бактерий. Классическим примером модификации мишени можно рассматривать штаммы метициллин-резистентного золотистого стафилококка, где устойчивость к β -лактамам обеспечивается экзогенным пенициллин-связывающим протеином, у которого транспептидазный домен нечувствителен к действию нескольких различных β -лактамов. Например, β -лактаманый антибиотик имеет структуру, аналогичную субстратам – предшественникам пептидогликана, что позволяет антибиотику связываться и вызывать ацилирование серина в активном центре, и это приводит к его ингибированию [31]. Другим примером модификации мишени является устойчивость к ванкомицину, которая возникает в результате приобретения кластера генов *Van* и обычно является причиной АМР энтерококков [32]. Из многих известных генов данного кластера гены *VanA* и *VanB*, в частности, определяют АМР у патогенных бактерий, поскольку они встречаются на МГЕ [33].

Другие примеры модификации мишени у патогенных бактерий включают точечные мутации или ферментативные изменения мишени [34]. Ферментативное изменение мишени наиболее полно изучено на примере резистентности к макролидам, обусловленной большой группой генов рибосомного метилирования эритромицина (*Erm*). Эти ферменты метилируют специфический аденин в 23S рРНК [35]. У патогенных бактерий гены *Erm* присутствуют на МГЕ и распространены как среди грамположительных, так и грамотрицательных бактерий [35, 36]. Самые известные примеры защиты мишеней у патогенных микроорганизмов включают белки Tet(M) и Tet(O), которые кодируют гены, расположенные на МГЕ у *St. aureus*. Было показано, что эти белки гомологичны факторам элонгации EF-G и EF-Tu, и их связывание с рибосомой облегчает удаление тетрациклина из бактериальной клетки в зависимости от активности GTP-азы [37]. Таким образом, можно сделать вывод, что большинство механизмов АМР бактерий, по-видимому, возникли из внутриклеточных механизмов устойчивости к условиям окружающей среды, и именно включение генетических детерминант АМР в МГЕ патогенных бактерий представляет серьезную угрозу для здоровья животных и человека.

ПРОИСХОЖДЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ У ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Вопрос о том, каким образом у патогенных бактерий появляются гены устойчивости к АМП, продолжает оставаться дискуссионным. Идея о том, что гены устойчивости патогенов могут быть получены от микроорганизмов – продуцентов антибиотиков путем горизонтального переноса была первоначально предложена в 1970-х гг. [38]. Несмотря на убедительные доказательства того, что их передача может происходить от организмов-продуцентов к патогенным видам, прямая связь в этом процессе между продуцентами и патогенами в настоящее время не выявлена и не доказана. Это связано в первую очередь с тем фактом, что гены устойчивости у продуцентов демонстрируют высокую дивергенцию последовательностей и очень разное содержание G + C по сравнению с детерминантами патогенов, даже когда они используют аналогичные механизмы. Но при этом эволюционную связь между генетическими детерминан-

тами АМР продуцентов и патогенов не отрицают [39]. На основании анализа данных, представленных в доступной литературе, можно предполагать, что передача этих детерминант от продуцентов к патогенным бактериям могла произойти через ряд тесно связанных близкородственных непродуцирующих актиномицет в почве и только потом – к протеобактериям и отдаленным (неродственным) патогенным видам [18].

РОЛЬ ГОРИЗОНТАЛЬНОЙ ПЕРЕДАЧИ ГЕНОВ (HORIZONTAL GENE TRANSFER, HGT) В АМР БАКТЕРИЙ

Передача генетических детерминант АМР между популяциями бактерий осуществляется с помощью механизмов, включающих трансформацию свободной ДНК, трансдукцию бактериофагами или конъюгацию с участием плазмид [14], которые в совокупности называются механизмами HGT. Все три механизма HGT широко используются в природе, хотя некоторые виды бактерий используют один механизм в большей степени, чем два других [40]. Стрептококки, например, используют для обмена генетической информацией трансформацию, тогда как энтеробактерии – конъюгативные плазмиды. Трансформация наиболее хорошо изучена у грамположительных *Streptococcus pneumoniae* и *Bacillus subtilis*, хотя она имеет место и у многих грамотрицательных бактерий. В то же время роль трансформации в физиологии бактерий остается дискуссионной, ее главной целью считают восстановление ДНК или генетическую диверсификацию для повышения адаптации бактерий [41]. Предполагают, что именно трансформация сыграла важную роль в эволюции устойчивых к антибиотикам представителей родов *Streptococcus* и *Neisseria*. Общепринятым считается мнение о том, что трансдукция также играет важную роль в эволюции АМР *St. aureus*, хотя было показано, что она встречается у многих бактерий с низкой частотой в диапазоне от 10^{-6} до 10^{-9} трансдуктантов/бляшкообразующих единиц [42]. Представители вида *St. aureus* являются высоковариабельными бактериями и имеют большой дополнительный геном, состоящий из фагов, плазмид, транспозонов, геномных островов и др. Традиционно полагают, что HGT в целом и трансдукция в частности играют важную роль в переносе генов устойчивости к антибиотикам [43], но из-за сложности обнаружения событий рекомбинации в естественных условиях (вне лаборатории) вклад трансформации или трансдукции в перенос генов АМР в клинических условиях или в окружающей среде остается неясным. Конъюгацию, опосредованную плазмидами, по-прежнему считают более важным механизмом в распространении генов АМР в природе, чем трансформацию или трансдукцию, ввиду того что плазмиды способны к автономной передаче как в окружающей среде, так и в лабораторных условиях [44]. Подтверждением этого являются наиболее известные плазмиды, которые привели к распространению генов устойчивости к карбапенемам и хинолонам у грамотрицательных бактерий на очень большие географические расстояния [45]. Другие элементы ДНК грамположительных бактерий, известные как конъюгативные транспозоны или интегративные конъюгативные элементы, также могут опосредовать конъюгацию. Эти элементы могут как интегрироваться в хромосому, так и вырезаться из нее и передаваться посредством конъюгации другим

бактериям [46]. Для переноса генов устойчивости посредством конъюгации необходима высокая концентрация бактерий, например, как в кишечнике животных и человека, биопленках на объектах окружающей среды, в условиях животноводческих помещений [45, 46]. Исходя из общепринятой концепции, некоторые детерминанты устойчивости были ассоциированы с плазмидами в течение длительного времени, в то время как другие мобилизуются в плазмиды из хромосом, и скорость, с которой эти гены мобилизуются, увеличилась в последние 70 лет, что связывают с широким применением антибиотиков [47].

Новые тенденции в распространении генов AMP:

– увеличение скорости мобилизации детерминанты устойчивости из хромосом в плазмиды;

– кластеризация генов устойчивости к антибиотикам в плазмидах, возможно, в ответ на селективное давление окружающей среды. Хорошо охарактеризованный механизм кластеризации обеспечивается конъюгированной плазмидой pSK41 *St. aureus*, содержащей инсерционную последовательность IS 257, которая способствует захвату небольших плазмид устойчивости [43].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При рассмотрении проблем, связанных с возникновением и распространением AMP бактерий, в качестве одной из основных причин этого явления указывают использование АМП в качестве лекарственных, дезинфицирующих средств и кормовых добавок в разных отраслях народного хозяйства. Естественные (природные) источники происхождения AMP, как правило, во внимание не принимают.

Анализ отечественной и зарубежной литературы позволяет заключить, что:

1. Первоисточниками генетических детерминант AMP были и остаются природные микроорганизмы – продуценты антимикробных веществ. Несмотря на препятствия для обмена генетической информацией между различными родами бактерий, произошел широко распространенный перенос генов AMP от хромосом бактерий окружающей среды к мобилизуемым элементам патогенных бактерий.

2. Микроорганизмы – продуценты антибиотиков имеют, как правило, не один, а множество сложных механизмов самозащиты, обеспечивающих полную защиту от производимых ими биологически активных молекул, и генетические детерминанты саморезистентности почти всегда сгруппированы с генами биосинтеза антибиотиков, и их экспрессия регулируется совместно. Поэтому для полного понимания развития AMP необходимо помимо часто упоминаемых причин AMP учитывать и естественные резервуары генов устойчивости, которые могут включать детерминанты, определяющие саморезистентность микроорганизмов, продуцирующих антибиотики, ввиду того что эти детерминанты устойчивости у представителей микрофлоры окружающей среды в дальнейшем могут привести к увеличению количества подобных детерминант в популяциях патогенных бактерий и возникновению проблем огромных масштабов. То есть для предупреждения распространения AMP необходимо изучать и контролировать распределение детерминант AMP в бактериальных популяциях, выяснять механизмы устойчивости и определять факторы окружающей среды, которые способствуют их распространению [8].

3. Большинство механизмов AMP бактерий, по-видимому, возникли из внутриклеточных механизмов устойчивости к условиям окружающей среды, и именно включение генетических детерминант AMP в MGE патогенных бактерий представляет серьезную угрозу для здоровья животных и человека. На основании анализа данных доступной литературы можно предполагать, что передача этих детерминант от продуцентов к патогенным бактериям могла произойти через ряд тесно связанных близкородственных непродуцирующих актиномицет в почве и только потом – к протеобактериям и отдаленным (неродственным) патогенным видам бактерий.

4. Новые тенденции в распространении генов AMP: увеличение скорости мобилизации детерминанты устойчивости из хромосом в плазмиды наблюдают в последние 70 лет; кластеризация генов устойчивости к антибиотикам в плазмидах, возможно, в ответ на селективное давление окружающей среды. Хорошо охарактеризованный механизм кластеризации обеспечивается конъюгированной плазмидой pSK41 *St. aureus*, которая содержит инсерционную последовательность IS 257, способствующую захвату небольших плазмид устойчивости.

Своевременное выявление изменений в распространении резистентности бактерий к антибиотикам имеет важное практическое и теоретическое значение, так как позволяет корректировать рекомендации по антибактериальной терапии в животноводстве, разрабатывать экспрессные молекулярные методы детекции антибактериальной резистентности, дает важную информацию для создания новых препаратов, преодолевающих резистентность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2. Geneva; 2001. Available at: https://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy_English.pdf.
2. WHO's first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health. Available at: <https://www.who.int/news/item/30-04-2014-who-s-first-global-report-on-antibiotic-resistance-reveals-serious-worldwide-threat-to-public-health> (date of access: 29.11.2021).
3. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. *EFSAJ*. 2021; 19 (4):e06490. DOI: 10.2903/j.efsa.2021.6490.
4. Bellini C., Troilet N. Résistance aux antibiotiques: état des lieux en Europe et en Suisse et impact pour le praticien = Antibiotic resistance: situation in Europe and Switzerland, and impact for the physician. *Rev. Med. Suisse*. 2016; 12 (534): 1699–1702. PMID: 28686394. (in French)
5. Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2. Режим доступа: https://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy_Russian.pdf (дата обращения: 29.11.2021).
Global'naya strategiya VOZ po sderzhivaniyu ustoichivosti k protivomikrobnym preparatam = WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2. Available at: https://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy_Russian.pdf (date of access: 29.11.2021). (in Russ.)
6. Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года: утв. распоряжением Правительства РФ от 25.09.2017 № 2045-р (с изменениями на 11.09.2021). Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/436775118> (дата обращения: 29.11.2021).
Strategiya preduprezhdeniya rasprostraneniya antimikrobnoi rezistentnosti v Rossiiskoi Federatsii na period do 2030 goda = Strategy for preventing the spread of antimicrobial resistance in the Russia Federation for the period to 2030 approved by Order of the Russian Federation Government No. 2045-r of 25.09.2017 (as amended on 11.09.2021). Available at: <https://docs.cntd.ru/document/436775118> (date of access: 29.11.2021). (in Russ.)
7. Abbanat D., Morrow B., Bush K. New agents in development for the treatment of bacterial infections. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2008; 8 (5): 582–592. DOI: 10.1016/j.coph.2008.08.001.

8. Peterson E., Kaur P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Front. Microbiol.* 2018; 9:2928. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02928.
9. Mak S., Xu Y., Nodwell J. R. The expression of antibiotic resistance genes in antibiotic-producing bacteria. *Mol. Microbiol.* 2014; 93 (3): 391–402. DOI: 10.1111/mmi.12689.
10. Fajardo A., Martínez-Martín N., Mercadillo M., Galán J. C., Ghysels B., Matthijs S., et al. The neglected intrinsic resistance of bacterial pathogens. *PLoS One.* 2008; 3 (2): e1619. DOI: 10.1371/journal.pone.0001619.
11. Cox G., Wright G. D. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int. J. Med. Microbiol.* 2013; 303 (6–7): 287–292. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.02.009.
12. Nikaido H., Takatsuka Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009; 1794 (5): 769–781. DOI: 10.1016/j.bbapap.2008.10.004.
13. Arthur M., Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993; 37 (8): 1563–1571. DOI: 10.1128/AAC.37.8.1563.
14. Wright G. D. The antibiotic resistance: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 2007; 5 (3): 175–186. DOI: 10.1038/nrmicro1614.
15. Bismuth R., Zilhao R., Sakamoto H., Guesdon J. L., Courvalin P. Gene heterogeneity for tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990; 34 (8): 1611–1614. DOI: 10.1128/AAC.34.8.1611.
16. Van Hoek A. H., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Roberts A. P., Aarts H. J. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front. Microbiol.* 2011; 2:203. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00203.
17. Dantas G., Sommer M. O. Context matters – the complex interplay between resistance genotypes and resistance phenotypes. *Curr. Opin. Microbiol.* 2012; 15 (5): 577–582. DOI: 10.1016/j.mib.2012.07.004.
18. Marshall C. G., Wright G. D. DdIN from vancomycin-producing *Amycolatopsis orientalis* C329.2 is a VanA homologue with D-alanyl-D-lactate ligase activity. *J. Bacteriol.* 1998; 180 (21): 5792–5795. DOI: 10.1128/JB.180.21.5792-5795.1998.
19. Benveniste R., Davies J. Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1973; 70 (8): 2276–2280. DOI: 10.1073/pnas.70.8.2276.
20. Yoon E. J., Goussard S., Touchon M., Krizova L., Cerqueira G., Murphy C., et al. Origin in *Acinetobacter guillouiae* and dissemination of the aminoglycoside-modifying enzyme Aph(3)-VI. *mBio.* 2014; 5 (5): e01972-14. DOI: 10.1128/mBio.01972-14.
21. Schwarz S., Kehrenberg C., Doublet B., Cloeckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol. Rev.* 2004; 28 (5): 519–542. DOI: 10.1016/j.femsre.2004.04.001.
22. Ambler R. P., Coulson A. F., Frère J. M., Ghuysen J. M., Joris B., Forsman M., et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem. J.* 1991; 276 (Pt 1): 269–270. DOI: 10.1042/bj2760269.
23. Lukac P. J., Bonomo R. A., Logan L. K. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in children: old foe, emerging threat. *Clin. Infect. Dis.* 2015; 60 (9): 1389–1397. DOI: 10.1093/cid/civ020.
24. Paterson D. L., Bonomo R. A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18 (4): 657–686. DOI: 10.1128/CMR.18.4.657-686.2005.
25. Martínez J. L. Ecology and evolution of chromosomal gene transfer between environmental microorganisms and pathogens. *Microbiol. Spectr.* 2018; 6 (1). DOI: 10.1128/microbiolspec.MTBP-0006-2016.
26. Li H., Luo Y. F., Williams B. J., Blackwell T. S., Xie C. M. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *Int. J. Med. Microbiol.* 2012; 302 (2): 63–68. DOI: 10.1016/j.ijmm.2011.10.001.
27. Schindler B. D., Kaatz G. W. Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria. *Drug. Resist. Updat.* 2016; 27: 1–13. DOI: 10.1016/j.drup.2016.04.003.
28. Thanassi D. G., Cheng L. W., Nikaido H. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1997; 179 (8): 2512–2518. DOI: 10.1128/jb.179.8.2512-2518.1997.
29. Roberts M. C. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005; 245 (2): 195–203. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.02.034.
30. Rudolf J. D., Bigelow L., Chang C., Cuff M. E., Lohman J. R., Chang C. Y., et al. Crystal structure of the zorbamycin-binding protein ZbmA, the primary self-resistance element in *Streptomyces flavoviridis* ATCC21892. *Biochemistry.* 2015; 54 (45): 6842–6851. DOI: 10.1021/acs.biochem.5b01008.
31. Yeats C., Finn R. D., Bateman A. The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain. *Trends Biochem. Sci.* 2002; 27 (9): 438. DOI: 10.1016/s0968-0004(02)02164-3.
32. Miller W. R., Munita J. M., Arias C. A. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2014; 12 (10): 1221–1236. DOI: 10.1586/14787210.2014.956092.
33. Li W., Sharma M., Kaur P. The DrrAB efflux system of *Streptomyces peucetius* is a multidrug transporter of broad substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 2014; 289 (18): 12633–12646. DOI: 10.1074/jbc.M113.536136.
34. Munita J. M., Arias C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol. Spectr.* 2016; 4 (2). DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
35. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; 39 (3): 577–585. DOI: 10.1128/AAC.39.3.577.
36. Roberts M. C. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 2008; 282 (2): 147–159. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01145.x.
37. Burdett V. Tet(M)-promoted release of tetracycline from ribosomes is GTP dependent. *J. Bacteriol.* 1996; 178 (11): 3246–3251. DOI: 10.1128/jb.178.11.3246-3251.1996.
38. Andersson D. I., Hughes D. Selection and transmission of antibiotic-resistant bacteria. *Microbiol. Spectr.* 2017; 5 (4). DOI: 10.1128/microbiolspec.MTBP-0013-2016.
39. Forsman M., Häggström B., Lindgren L., Jaurin B. Molecular analysis of beta-lactamases from four species of *Streptomyces*: comparison of amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *J. Gen. Microbiol.* 1990; 136 (3): 589–598. DOI: 10.1099/00221287-136-3-589.
40. Barlow M., Reik R. A., Jacobs S. D., Medina M., Meyer M. P., McGowan J. E. Jr., Tenover F. C. High rate of mobilization for blaCTX-Ms. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14 (3): 423–428. DOI: 10.3201/eid1403.070405.
41. Johnston C., Martin B., Fichant G., Polard P., Claverys J. P. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat. Rev. Microbiol.* 2014; 12 (3): 181–196. DOI: 10.1038/nrmicro3199.
42. Varga M., Kuntová L., Pantůček R., Mašláňová I., Růžičková V., Doškař J. Efficient transfer of antibiotic resistance plasmids by transduction within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone. *FEMS Microbiol. Lett.* 2012; 332 (2): 146–152. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02589.x.
43. Haaber J., Penadés J. R., Ingmer H. Transfer of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 2017; 25 (11): 893–905. DOI: 10.1016/j.tim.2017.05.011.
44. Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *Int. J. Med. Microbiol.* 2013; 303 (6–7): 298–304. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.02.001.
45. Roberts A. P., Mullany P. Tn916-like genetic elements: a diverse group of modular mobile elements conferring antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 2011; 35 (5): 856–871. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00283.x.
46. Thomas C. M., Nielsen K. M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005; 3 (9): 711–721. DOI: 10.1038/nrmicro1234.
47. Domingues S., da Silva G. J., Nielsen K. M. Integrons: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. *Mob. Genet. Elements.* 2012; 2 (5): 211–223. DOI: 10.4161/mge.22967.

Поступила в редакцию / Received 24.12.2021

Доработана после рецензирования / Revised 11.02.2022

Принята к публикации / Accepted 03.03.2022

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Прунтова Ольга Владиславовна, доктор биологических наук, профессор, главный эксперт информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Русалеев Владимир Сергеевич, доктор ветеринарных наук, профессор, научный секретарь ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Шадрова Наталья Борисовна, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией микробиологических исследований ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Olga V. Pruntova, Doctor of Science (Biology), Professor, Chief Expert, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Vladimir S. Russaleyev, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Scientific Secretary, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Natalya B. Shadrova, Candidate of Science (Biology), Head of Laboratory for Microbiological Testing, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.



Антибиотикорезистентность клинических изолятов *Escherichia coli*, выделенных от животных

М. Н. Исакова¹, О. В. Соколова², Н. А. Безбородова³, А. С. Кривоногова⁴, А. Г. Исаева⁵, В. Д. Зубарева⁶

ФГБНУ «Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук»
(ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН), г. Екатеринбург, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0001-7130-5627>, e-mail: tmarya105@yandex.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-1169-4090>, e-mail: nauka_sokolova@mail

³ <https://orcid.org/0000-0003-2793-5001>, e-mail: n-bezborodova@mail.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0003-1918-3030>, e-mail: tel-89826512934@yandex.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0001-8395-1247>, e-mail: isaeva.05@bk.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0003-0284-0276>, e-mail: zzub97@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Представлены данные о фенотипической и генотипической характеристике антибиотикорезистентности клинических изолятов *Escherichia coli*, выделенных из микробных биотопов (секрет молочной железы, цервикальные смывы) крупного рогатого скота. Исследовано 127 изолятов кишечной палочки, в том числе 44 – из секрета молочной железы, 83 – из цервикальных смывов. Антибиотикорезистентность культур изучали диско-диффузионным методом, минимальные ингибирующие концентрации антибактериальных препаратов определяли методом серийных разведений, гены резистентности детектировали с помощью полимеразной цепной реакции. В результате исследований показано широкое распространение изолятов микроорганизмов с фенотипом резистентности к ансамицинам (рифампицину), полусинтетическим пенициллинам (ампициллину и амоксициллину), тетрациклинам (доксикацилину). Меньший уровень устойчивости изоляты проявляли к макролидам (азитромицину), амфениколам (левомецетину) и аминогликозидам (тобрамицину). Установлено, что клинические изоляты *Escherichia coli* чувствительны к цефалоспорином III поколения и противомикробным средствам из группы фторхинолонов. Однако регистрация у 28,46% культур промежуточной резистентности к цефалоспорином III поколения и выявление гена blaDHA, ассоциированного с развитием устойчивости к данной группе препаратов в 49,02% образцов ДНК эшерихий, изолированных из секрета молочной железы, не позволяют рекомендовать их в качестве препаратов выбора. Отсутствие гена VIM, кодирующего продукцию карбапенемаз в ДНК у выделенных изолятов, и низкий уровень фенотипической устойчивости (10,22% изолятов из цервикальных смывов) может служить одной из предпосылок для рекомендации использования карбапенемов 1-го ряда в качестве препаратов выбора для терапии заболеваний животных, ассоциированных с *Escherichia coli*, наряду со фторхинолонами, однако только в качестве препаратов резерва. Установлено, что выделенные изоляты *Escherichia coli* демонстрировали большую чувствительность к комбинированным противомикробным лекарственным средствам в сравнении с монопрепаратами.

Ключевые слова: фенотипическая и генетическая резистентность, *Escherichia coli*, изоляты, генетические маркеры, микробные биотопы, грамотрицательные бактерии, β -лактамазы расширенного спектра, антибиотики

Благодарности: Исследования выполнены в рамках Государственного задания Минобрнауки России по теме № 0532-2021-0004 «Разработка методологических подходов к мониторингу, контролю и сдерживанию антибиотикорезистентности оппортунистических микроорганизмов в животноводстве».

Для цитирования: Исакова М. Н., Соколова О. В., Безбородова Н. А., Кривоногова А. С., Исаева А. Г., Зубарева В. Д. Антибиотикорезистентность клинических изолятов *Escherichia coli*, выделенных от животных. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (1): 14–19. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-14-19.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Исакова Мария Николаевна, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник отдела репродуктивных технологий ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, 620142, Россия, г. Екатеринбург, ул. Белинского, 112 а, e-mail: tmarya105@yandex.ru.

Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolates obtained from animals

M. N. Isakova¹, O. V. Sokolova², N. A. Bezborodova³, A. S. Krivonogova⁴, A. G. Isaeva⁵, V. D. Zubareva⁶

Federal State Budgetary Scientific Institution "Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences"
(FSBSI UrFASRC, UrB of RAS), Ekaterinburg, Russia

¹ <https://orcid.org/0000-0001-7130-5627>, e-mail: tmarya105@yandex.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-1169-4090>, e-mail: nauka_sokolova@mail

³ <https://orcid.org/0000-0003-2793-5001>, e-mail: n-bezborodova@mail.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0003-1918-3030>, e-mail: tel-89826512934@yandex.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0001-8395-1247>, e-mail: isaeva.05@bk.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0003-0284-0276>, e-mail: zzub97@mail.ru

SUMMARY

The article presents data on the phenotypic and genotypic characteristics of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* clinical isolates recovered from bovine microbiota (secretions from mammary glands, cervical swabs). 127 *Escherichia coli* isolates were studied, i.e. 44 from mammary glands secretions and 83 from cervical swabs. Disk diffusion method was used to study antimicrobial resistance of the cultures; minimum inhibitory concentrations of antimicrobials were determined in a serial dilution method; resistance genes were detected by polymerase chain reaction. The carried out research demonstrates a wide distribution of the isolates belonging to the phenotype resistant to ansamycins (rifampicin), semi-synthetic penicillins (ampicillin and amoxicillin), tetracyclines (doxycycline). The isolates showed a lower level of resistance to macrolides (azithromycin), amphenicols (levomycetin) and aminoglycosides (tobramycin). It was found that *Escherichia coli* clinical isolates are sensitive to third-generation cephalosporins and fluoroquinolone antimicrobials. However, since 28.46% of cultures demonstrate intermediate resistance to third-generation cephalosporins and 49.02% of *Escherichia coli* DNA samples isolated from mammal gland secretions had blaDHA gene associated with resistance to this group of antimicrobials, these antimicrobials could be hardly recommended as antibiotics of choice. Absence of VIM carbapenemase-encoding gene in the DNA of the recovered isolates and a low level of phenotypic resistance (10.22% of isolates from cervical swabs) can be one of the reasons for recommending first-line carbapenems as antibiotics of choice to treat animal diseases associated with *Escherichia coli*, along with fluoroquinolones as reserve antimicrobials. It was found that the recovered *Escherichia coli* isolates are more sensitive to combination antibiotics than to mono-antibiotics.

Keywords: phenotypic and genetic resistance, *Escherichia coli*, isolates, genetic markers, microbiota, gram-negative bacteria, extended-spectrum β -lactamases, antibiotics

Acknowledgements: The research was carried out in the framework of the State Assignment of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation No. 0532-2021-0004 "Developing methodological approaches for monitoring, control and containment of ARM in opportunistic pathogens in livestock production".

For citation: Isakova M. N., Sokolova O. V., Bezborodova N. A., Krivonogova A. S., Isaeva A. G., Zubareva V. D. Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolates obtained from animals. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (1): 14–19. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-14-19.

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

For correspondence: Mariya N. Isakova, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Department of Reproductive Technologies, FSBSI UrFASRC UrB of RAS, 620142, Russia, Ekaterinburg, ul. Belinsky, 112 a, e-mail: tmarya105@yandex.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Escherichia coli является наиболее распространенным грамотрицательным бактериальным патогеном, представляющим как клиническую, так и эпидемиологическую проблему, вызывает ряд инфекционно-воспалительных заболеваний у животных [1–3].

В настоящее время нарушение схем и протоколов антимикробной химиотерапии в животноводстве создает условия для формирования резервуара резистентных штаммов *E. coli* в организме животных, которые способны передаваться человеку, в том числе через пищевые продукты и объекты, контаминированные устойчивыми к антимикробным препаратам бактериями, что представляет собой серьезную эпидемиологическую угрозу [3–7].

Устойчивость изолятов кишечной палочки к антибактериальным препаратам обусловлена как природной резистентностью микроорганизма к основным клинически значимым антимикробным веществам, так и реализацией генетически детерминированных молекулярных механизмов устойчивости и вирулентности, приобретенных главным образом за счет горизонтального переноса кодирующих их носителей генетической информации [8–11]. Внехромосомные факторы создают основу формирования резистентности быстрого типа, которая способна реализоваться в течение 1–2 лет [12].

Данные мониторинга антимикробной резистентности (АМР) клинических изолятов *E. coli*, выделенных от животных на территории Российской Федерации,

неполные и различаются локально в зависимости от региона и периода исследований [13–15].

При этом для проведения рациональной антибактериальной терапии у сельскохозяйственных животных необходимо изучение устойчивости кишечной палочки к антимикробным препаратам.

В связи с вышеизложенным целью данной работы явилось изучение фенотипической и генотипической антибиотикорезистентности клинических изолятов *E. coli*, выделенных от крупного рогатого скота на территории Уральского региона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые образцы. Независимо полученные изоляты *E. coli* ($n = 127$) были выделены в период с 2016 по 2021 г. из клинических материалов от крупного рогатого скота животноводческих организаций Уральского региона.

Питательные среды или реактивы. В работе применяли дифференциально-диагностические питательные среды: среду Эндо, среду Левина, среду с сорбитом, мясопептонный агар (МПА), кровяной агар, агар Манка, среду Олькеницкого, среду Симмонса (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия). Биохимические свойства бактериальных культур определяли с помощью набора реактивов «Пластинки биохимические, дифференцирующие энтеробактерии (ПБДЭ)» (ООО «НПО «Диагностические системы», Россия) согласно инструкциям производителя.

Микробиологические исследования проводили в соответствии с «Методическими указаниями по бактериологической диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных», утвержденными Минсельхозом России 27 июля 2000 г № 13-7-2/2117 [16].

У выделенных культур *E. coli* изучали биохимические свойства: образование уреазы, β -D-галактозидазы, β -глюкозидазы, фосфатазы, лизиндекарбоксилазы, орнитиндекарбоксилазы, аргининдегидролазы, нитритредуктазы, сероводорода, индола, ацетоина (ацетилметилкарбинола); ферментацию глюкозы, сахарозы, маннита, трегалозы, лактозы, маннозы, ксилозы, рибозы, целлобиозы, малоната, цитрата, цитрата натрия с глюкозой, инозитола, сорбитола, арабинозы, мальтозы.

Учет результатов биохимических реакций проводили визуально. Выделенные культуры идентифицировали по определителю бактерий Берджи¹.

Фенотип резистентности выделенных изолятов к 15 антимикробным препаратам (АМП) из 10 групп (ансамбицины, тетрациклины, цефалоспорины III поколения, пенициллины, макролиды, фторхинолоны II поколения, амфениколы, аминогликозиды, гликопептиды, карбапенемы) определяли диско-диффузионным методом в соответствии с МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» [17]. В работе использовали стандартные коммерческие диски (ООО «НИЦФ», Россия) с известным содержанием действующего вещества: меропенем – 10 мкг, ципрофлоксацин – 5 мкг, рифампицин – 5 мкг, офлоксацин – 5 мкг, ампициллин – 10 мкг, амоксициллин – 20 мкг, левомецетин – 30 мкг, доксициклин – 30 мкг, цефтриаксон – 30 мкг, энрофлоксацин – 5 мкг, тетрациклин – 30 мкг, азитромицин – 15 мкг, ванкомицин – 30 мкг, гентамицин – 120 мкг, тобрамицин – 10 мкг. Интерпретацию результатов осуществляли с учетом рекомендаций Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам [18].

Определение минимальных ингибирующих концентраций (МИК) антибактериальных препаратов, в том числе комплексных лекарственных средств, предназначенных для лечения воспалительных заболеваний молочной железы и органов репродуктивной системы (для изолятов, выделенных из секрета молочной железы и цервикальных смывов животных), проводили методом серийных разведений с добавлением бактериальной суспензии, содержащей 10^7 бактерий в 1 мл. В качестве контроля чистоты роста культур использовали бульон и взвесь бактерий без антибиотика, для контроля стерильности среды – бульон с антибиотиком без культуры. Посевы инкубировали в термостате в течение 24 ч [17].

Молекулярно-генетические исследования с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили в соответствии с инструкциями к коммерческим тест-системам. В работе использовали набор для выделения ДНК Diatom DNA Prep 200 (ООО «Лаборатория Изоген», Россия). Генетические детерминанты резистентности к АМП выявляли в ПЦР с использованием наборов реагентов компании ООО «НПФ «Литех» (Рос-

сия). Определяли ген blaDHA, кодирующий плазмидоопосредованную β -лактамазу AmpC и обуславливающий резистентность бактерий семейства *Enterobacteriaceae* к защищенным пенициллинам и цефалоспорином широкого спектра действия [16, 17, 19, 20]; ген CTX-M, кодирующий β -лактамазы расширенного спектра, мобилизованный подвижными генетическими элементами (транспозонами, интегронами, IS-элементами) и опосредующий формирование мультирезистентности; ген VIM, расположенный на неконъюгативной плазмиде, включающей интегрон 1-го класса и обуславливающий продуцирование карбапенемаз. ПЦР проводили в режиме реального времени с применением анализатора Applied Biosystems QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

При статистической обработке данных использовали стандартный пакет Microsoft Excel 2010 и методы описательной статистики: проценты, частоты, частотное распределение и т. д.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение АМП изолятов *E. coli* диско-диффузионным методом. Результаты изучения антибиотикорезистентности 127 изолятов *E. coli*, выделенных из биологического материала от коров, представлены на рисунке.

Профиль АМП изолятов *E. coli*, выделенных из секрета молочной железы, характеризовался высокими показателями устойчивости (54,54%) к группе пенициллинов, при этом к ампициллину были резистентными 49,99% культур, а к амоксициллину – 4,55%. Резистентностью к рифампицину и группе тетрациклинов обладали 47,72 и 45,46% изолятов кишечной палочки соответственно. К группе амфениколов (левомецетин) невосприимчивыми оказались 15,91% культур кишечной палочки. У 11,36% изолятов выявлена резистентность к аминогликозидам (тобрамицин). Минимальное количество резистентных изолятов кишечной палочки выявлено в отношении антимикробных препаратов следующих групп: фторхинолоны II поколения (ципрофлоксацин – 2,27%, энрофлоксацин – 4,55%, офлоксацин – 6,82%), макролиды (азитромицин – 4,55%), цефалоспорины III поколения (цефтриаксон – 6,82%).

Установлено, что 31,81% изолятов кишечной палочки, выделенных из секрета молочной железы коров, показали промежуточную резистентность к тобрамицину, относящемуся к группе аминогликозидов. К левомецетину промежуточной резистентностью обладали 29,55% выделенных культур *E. coli*, к ципрофлоксацину и цефтриаксону – 22,73% изолятов кишечной палочки. К представителям групп тетрациклинов (доксициклин) и фторхинолонов II поколения (энрофлоксацин) промежуточная резистентность была выявлена у 15,91% изолятов.

Среди изолятов *E. coli*, выделенных из цервикальных смывов от коров, преобладали фенотипы, устойчивые к антимикробным препаратам из группы пенициллинов: к ампициллину и амоксициллину были невосприимчивы 42,17 и 36,15% культур. У 53,01% изолятов обнаружена устойчивость к рифампицину – основному представителю группы ансамбицинов. К доксициклину устойчивыми оказались 25,30% изолятов кишечной палочки, а к тетрациклину – 7,23%. Минимальное количество изолятов *E. coli* было резистентным к цефалоспорином III поколения (3,61%) и аминогликози-

¹ Определитель бактерий Берджи: в 2-х томах. Т. 1. Под ред. Дж. Хоул-та, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. 9-е изд. М.: Мир; 1997. 432 с.

дам, а именно к гентамицину (2,41%). К представителю группы цефалоспоринов III поколения – цефтриаксону – промежуточная резистентность установлена у 32,53% изолятов. В отношении 30,65% изолятов выявлена промежуточная устойчивость к группе карбапенемов. К левомицетину промежуточной резистентностью обладали 27,02% культур *E. coli*. К представителям группы фторхинолонов II поколения, а именно цiproфлоксацину, офлоксацину и энрофлоксацину, промежуточная устойчивость выявлена у 16,87; 22,8 и 16,87% изолятов соответственно.

Результаты изучения АМП 127 изолятов *E. coli* показали, что многие из них обладают полирезистентностью: 64,5% изученных культур устойчивы к четырем классам АМП, 54,33% – к пяти классам. Мультирезистентными, характеризующимися устойчивостью к шести классам АМП, были 16,6% изолятов бактерий.

Определение МИК антибактериальных препаратов коммерческого производства. Наибольшей резистентностью изоляты *E. coli*, выделенные из секрета молочной железы коров, обладали к лекарственным средствам, в состав которых входит действующее вещество клоксациллин (группа пенициллинов) – 13,64%. Комбинированные антибактериальные препараты на основе клоксацилина были наиболее активны в отношении *E. coli*. Так, при совместном использовании АМП клоксациллин + бензатин и клоксациллин + неомицин, сульфат + дексаметазон + трипсин устойчивость регистрировали только у 6,82% изолятов, при комбинации клоксациллин + ампициллин + бензатиновая кислота – у 2,27% изолятов. У 6,81% культур кишечной палочки обнаружена резистентность к препаратам цефалоспоринового ряда I поколения на основе цефалония и цефапирина. Наименьшая устойчивость выявлена к комбинированным препаратам из групп тетрациклинов (2,27%) и аминогликозидов (1,30%). К антимикробным средствам групп цефалоспоринов II и III поколения промежуточную резистентность имели 4,34 и 4,55% изолятов соответственно.

Культуры *E. coli*, выделенные из цервикальных смывов от коров, наибольшую резистентность демонстрировали к лекарственным средствам на основе синтетического противогрибкового средства из группы производных имидазола – 12,05%. К коммерческим препаратам, содержащим вещества из групп макролидов и ансамицинов, устойчивыми были соответственно 6,02 и 8,40% изолятов. К полипептидному антибиотику на основе колистина сульфата и тилозина тартрата промежуточной резистентностью обладали 4,82% изолятов. В отношении 4,80% изолятов установлена промежуточная устойчивость к препарату на основе хлортетрациклина гидрохлорида.

Детекция генетических детерминант резистентности у изолятов *E. coli*. При молекулярно-генетических исследованиях ген СТХ-М, обуславливающий резистентность бактерий семейства *Enterobacteriaceae* к фторхинолонам и цефалоспорином I поколения (цефазолин), был обнаружен в специфических участках ДНК *E. coli* в 9,56% случаев, при этом 6,95% культур выделены из секрета молочной железы и 2,61% изолированы из цервикальных смывов. Ген blaDNA, определяющий устойчивость к защищенным пенициллинам (ампициллину, амоксициллину, тикарциллину, пиперациллину, тазобактаму) и цефалоспорином III и IV поколения (цефотаксиму, цефоперазону, цефтриаксону,

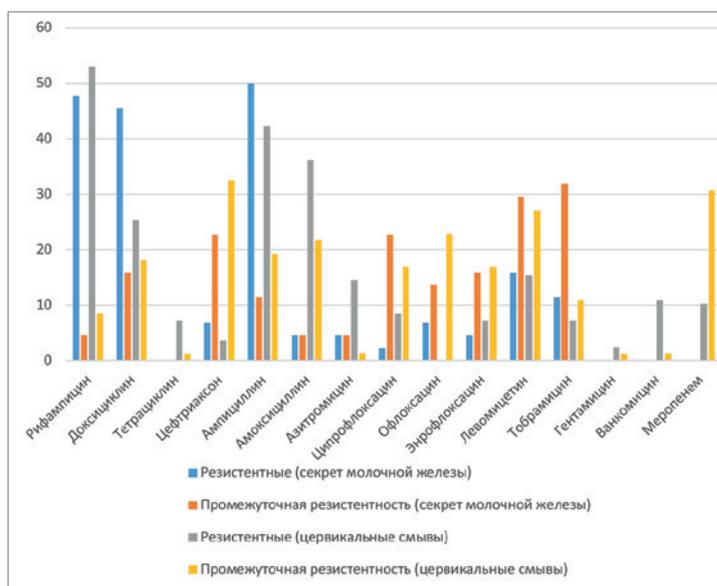


Рис. Профиль антибиотикорезистентности клинических изолятов *Escherichia coli*, выделенных от крупного рогатого скота (%)

Fig. ARM profile of *Escherichia coli* clinical isolates recovered from cattle (%)

цефтибутену, цефтазидиму, цефиксиму, цефподоксиму, цефодизиму, цефетамету), выявлен в 49,02% образцов ДНК *E. coli*, изолированной из секрета молочной железы. Ген VIM, кодирующий продукцию карбапенемаз и обуславливающий устойчивость к карбапенемам 1-го ряда (меропенем, имипенем, дорипенем), не был детектирован ни в одной из ДНК *E. coli*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ фенотипических и генотипических характеристик 127 клинических изолятов *E. coli* показал превалирование культур микроорганизмов (64,5%), резистентных к ансамицинам, полусинтетическим пенициллинам, тетрациклинам (доксидциклину).

Наибольшую активность в отношении кишечной палочки проявляли фторхинолоны, которые могут быть рекомендованы для лечения заболеваний репродуктивной системы коров, обусловленных данным возбудителем. Клинические изоляты эшерихий были чувствительны к цефалоспорином III поколения. Однако присутствие в этой группе микроорганизмов 28,46% изолятов с промежуточной резистентностью и выявление гена blaDNA в 49,02% образцов ДНК *E. coli* не позволяет рекомендовать данные препараты для проведения антимикробной терапии в отношении инфекций, вызванных кишечной палочкой [21].

В результате проведенных исследований установлена высокая устойчивость к карбапенемам (10,22%), что является неблагоприятным прогностическим признаком, подтверждающим общую эпидемиологическую тенденцию к распространению резистентных к этим антимикробным средствам культур микроорганизмов. Необходимо подчеркнуть, что карбапенемы применяются в медицине только в качестве антибактериальных препаратов резерва [22]. Отсутствие детекции гена VIM не исключает наличия других генов, кодирующих продукцию карбапенемаз.

В целом тенденция к формированию устойчивости к карбапенемам и цефалоспорином III поколения является маркером полирезистентности бактерий семейства *Enterobacteriaceae* [23].

У выделенных изолятов установлена чувствительность к антибактериальным средствам в составе комплексных лекарственных препаратов. Однако их широкое применение несет риск формирования перекрестной резистентности к АМП из разных групп и развития полирезистентности.

Результаты изучения фенотипической и генотипической антибиотикорезистентности клинических изолятов *E. coli*, выделенных от крупного рогатого скота на территории Уральского региона, имеют важное значение в системном подходе к рациональной фармакотерапии, контроле и сдерживании распространения устойчивости к антибиотикам в животноводстве.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Paitan Y. Current Trends in Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2018; 416: 181–211. DOI: 10.1007/82_2018_110.
- Kaushik P, Anjay A, Kumari S, Dayal S, Kumar S. Antimicrobial resistance and molecular characterisation of *E. coli* from poultry in Eastern India. *Vet. Ital.* 2018; 54 (3): 197–204. DOI: 10.12834/VetIt.330.1382.2.
- Krivotogova A., Isaeva A., Poryvaeva A., Chentsova A., Sharavyev P. Inhibitory effect of plant metabolites of *Nigella sativa* on conditionally pathogenic microflora of productive animals. *E3S Web of Conferences EFSC*. 2021; 282:04014. DOI: 10.1051/e3sconf/202128204014.
- Gregova G., Kmet V. Antibiotic resistance and virulence of *Escherichia coli* strains isolated from animal rendering plant. *Sci. Rep.* 2020; 10 (1):17108. DOI: 10.1038/s41598-020-72851-5.
- Lalak A., Wasyl D., Zając M., Skarżyńska M., Hoszowski A., Samcik I., et al. Mechanisms of cephalosporin resistance in indicator *Escherichia coli* isolated from food animals. *Vet. Microbiol.* 2016; 194: 69–73. DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.01.023.
- Ranjbar R., Moradi H., Harzandi N., Kheiri R., Khamesipour F. Интегрон-зависимые механизмы резистентности к антибиотикам у штаммов *Escherichia coli*, выделенных из человека и животных в двух провинциях Ирана. *Современные технологии в медицине.* 2019; 11 (4): 64–73. DOI: 10.17691/stm2019.11.4.07.
- Buberg M. L., Mo S. S., Sekse C., Sunde M., Wasteson Y., Witsø I. L. Population structure and uropathogenic potential of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from retail chicken meat. *BMC Microbiol.* 2021; 21 (1):94. DOI: 10.1186/s12866-021-02160-y.
- Reshadi P., Heydari F., Ghanbarpour R., Bagheri M., Jajarmi M., Amiri M., et al. Molecular characterization and antimicrobial resistance of potentially human-pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from riding horses. *BMC Vet. Res.* 2021; 17 (1): 131. DOI: 10.1186/s12917-021-02832-x.
- Poirol L., Madec J. Y., Lupo A., Schink A. K., Kieffer N., Nordmann P., Schwarz S. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* 2018; 6 (4). DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017.
- Аль-Хаммаш Н. М., Игнатенко А. В. Анализ антибиотикорезистентности микроорганизмов *E. coli*. *Труды БГТУ. Химия, технология органических веществ и биотехнология.* 2012; 4 (151): 173–175. eLIBRARY ID: 22002362.
- Nolivos S., Cayron J., Dedieu A., Page A., Delolme F., Lesterlin C. Role of AcrAB-TolC multidrug efflux pump in drug-resistance acquisition by plasmid transfer. *Science.* 2019; 364 (6442): 778–782. DOI: 10.1126/science.aav6390.
- Ilbeigi K., Askari Badouei M., Vaezi H., Zaheri H., Aghasharif S., Kafshdouzan K. Molecular survey of mcr1 and mcr2 plasmid mediated colistin resistance genes in *Escherichia coli* isolates of animal origin in Iran. *BMC Res. Notes.* 2021; 14 (1):107. DOI: 10.1186/s13104-021-05519-6.
- Фармакология с рецептурой: учебник для медицинских и фармацевтических учреждений среднего профессионального образования. Под ред. В. М. Виноградова. 6-е изд., испр. и доп. СПб.: СпецЛит; 2016. 647 с.
- Парамонова Н. Ю., Фириченкова С. В. Результаты территориального мониторинга антибиотикорезистентности кишечной палочки. *Вестник ветеринарии.* 2011; 4 (59): 78–80. eLIBRARY ID: 17069905.
- Литвинова А. Р., Шевченко А. А. Распространение *E. coli* в Краснодарском крае. *Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии.* 2020; 1: 44–46. DOI: 10.17238/issn2072-6023.2020.1.44.
- Методические указания по бактериологической диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных: утв. Минсельхозом РФ

от 27.07.2000 № 13-7-2/2117. Режим доступа: <https://standartgost.ru/g/pkey-14293737720>.

17. МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. М.: Федеральный центр государственного надзора Минздрава России. 2004. 91 с. Режим доступа: https://fcgje.ru/download/elektronnaya_baza_metod_dokum/muk_1890-04.pdf.

18. Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам. Таблицы пограничных значений для интерпретации значений МПК и диаметров зон подавления роста. Версия 10.0, 2020. Режим доступа: <https://iacmac.ru/ru/docs/eucast/eucast-clinical-breakpoints-bacteria-10.0-rus.pdf>.

19. Bezborodova N. A., Isakova M. N., Ryapsova M. V., Sokolova O. V. Analysis of the antibiotic resistance genes of microorganisms in the milk of cows and goats. *Reproduction in Domestic Animals.* 2019; 54 (S3):104. DOI: 10.1111/rda.13528.

20. Ingti B., Paul D., Maurya A. P., Bora D., Chanda D. D., Chakravarty A., Bhattacharjee A. Occurrence of *bla*_{DHA-1} mediated cephalosporin resistance in *Escherichia coli* and their transcriptional response against cephalosporin stress: a report from India. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2017; 16 (1):13. DOI: 10.1186/s12941-017-0189-x.

21. ECDC. The bacterial challenge: time to react. Stockholm. 2009. 42 p. DOI: 10.2900/2518.

22. Кузьмина А. В., Асеева И. Л., Поливанов В. А., Зырянов С. К. Медицинские ошибки при применении антибактериальных препаратов группы карбапенемов. *Качественная клиническая практика.* 2016; 4: 48–53. eLIBRARY ID: 29246908.

23. Макавчик С. А., Кротова А. Л., Баргман Ж. Е., Сухинин А. А., Приходько Е. И. Механизмы резистентности к антимикробным препаратам у микроорганизмов, выделенных от крупного рогатого скота. *Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии.* 2020; 4: 41–46. DOI: 10.17238/issn2072-6023.2020.4.41.

REFERENCES

- Paitan Y. Current Trends in Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2018; 416: 181–211. DOI: 10.1007/82_2018_110.
- Kaushik P, Anjay A, Kumari S, Dayal S, Kumar S. Antimicrobial resistance and molecular characterisation of *E. coli* from poultry in Eastern India. *Vet. Ital.* 2018; 54 (3): 197–204. DOI: 10.12834/VetIt.330.1382.2.
- Krivotogova A., Isaeva A., Poryvaeva A., Chentsova A., Sharavyev P. Inhibitory effect of plant metabolites of *Nigella sativa* on conditionally pathogenic microflora of productive animals. *E3S Web of Conferences EFSC*. 2021; 282:04014. DOI: 10.1051/e3sconf/202128204014.
- Gregova G., Kmet V. Antibiotic resistance and virulence of *Escherichia coli* strains isolated from animal rendering plant. *Sci. Rep.* 2020; 10 (1):17108. DOI: 10.1038/s41598-020-72851-5.
- Lalak A., Wasyl D., Zając M., Skarżyńska M., Hoszowski A., Samcik I., et al. Mechanisms of cephalosporin resistance in indicator *Escherichia coli* isolated from food animals. *Vet. Microbiol.* 2016; 194: 69–73. DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.01.023.
- Ranjbar R., Moradi H., Harzandi N., Kheiri R., Khamesipour F. Integrin-associated antibiotic resistance patterns in *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources in two provinces of Iran. *Sovremennye tehnologii v medicine.* 2019; 11 (4): 64–73. DOI: 10.17691/stm2019.11.4.07. (in Russ.)
- Buberg M. L., Mo S. S., Sekse C., Sunde M., Wasteson Y., Witsø I. L. Population structure and uropathogenic potential of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from retail chicken meat. *BMC Microbiol.* 2021; 21 (1):94. DOI: 10.1186/s12866-021-02160-y.
- Reshadi P., Heydari F., Ghanbarpour R., Bagheri M., Jajarmi M., Amiri M., et al. Molecular characterization and antimicrobial resistance of potentially human-pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from riding horses. *BMC Vet. Res.* 2021; 17 (1):131. DOI: 10.1186/s12917-021-02832-x.
- Poirol L., Madec J. Y., Lupo A., Schink A. K., Kieffer N., Nordmann P., Schwarz S. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* 2018; 6 (4). DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017.
- Al-Khammash N. M., Ignatenko A. V. Analiz antibiotikorezistentnosti mikroorganizmov *E. coli* = ARM analysis of *E. coli*. *Proceedings of BSTU. Chemistry, organic substances technology and biotechnology.* 2012; 4 (151): 173–175. eLIBRARY ID: 22002362.
- Nolivos S., Cayron J., Dedieu A., Page A., Delolme F., Lesterlin C. Role of AcrAB-TolC multidrug efflux pump in drug-resistance acquisition by plasmid transfer. *Science.* 2019; 364 (6442): 778–782. DOI: 10.1126/science.aav6390.
- Ilbeigi K., Askari Badouei M., Vaezi H., Zaheri H., Aghasharif S., Kafshdouzan K. Molecular survey of mcr1 and mcr2 plasmid mediated colistin resistance genes in *Escherichia coli* isolates of animal origin in Iran. *BMC Res. Notes.* 2021; 14 (1):107. DOI: 10.1186/s13104-021-05519-6.
- Farmakologiya s retsepturoi: uchebnik dlya meditsinskikh i farmatsevticheskikh uchrezhdenii srednego professional'nogo obrazovaniya = 2016. 647 s.
- Paramonova N. Yu., Firichenkova S. V. Rezultaty territorial'nogo monitoringa antibiotikorezistentnosti kishchnoy palochki. *Vestnik veterinar'ii.* 2011; 4 (59): 78–80. eLIBRARY ID: 17069905.
- Litvinova A. R., Shevchenko A. A. Rasprostraneniye *E. coli* v Krasnodarskom krae. *Voprosy normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinar'ii.* 2020; 1: 44–46. DOI: 10.17238/issn2072-6023.2020.1.44.
- Metodicheskiye ukazaniya po bakteriolozhicheskoy diagnostike kolibakterioza (esherihioza) zhivotnykh: utv. Minsel'khozom RF

Pharmaceutical formulation: a textbook for medical and pharmaceutical institutions of secondary vocational education. Ed. by V. M. Vinogradov. 6th ed., revised and updated. Saint Petersburg: SpetsLit; 2016. 647 p. (in Russ.)

14. Paramonova N. Yu., Firichenkova S. V. Territorial monitoring data on antibiotic resistance in colibacillus. *Vestnik veterinarii*. 2011; 4 (59): 78–80. eLIBRARY ID: 17069905. (in Russ.)

15. Litvinova A. R., Shevchenko A. A. Distribution of *E. coli* in the Krasnodar territory. *Issues of Legal Regulation in Veterinary Medicine*. 2020; 1: 44–46. DOI: 10.17238/issn2072-6023.2020.1.44. (in Russ.)

16. Metodicheskie ukazaniya po bakteriologicheskoi diagnostike kolibakterioza (esherikhioza) zhivotnykh = Guidance on bacteriological diagnosis of colibacteriosis in animals: approved. Ministry of Agriculture of the Russian Federation July 27, 2000 No. 13-7-2/2117. Available at: <https://standartgost.ru/g/pkey-14293737720>. (in Russ.)

17. МУК 4.2.1890-04 Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam = Methodical Guidelines 4.2.1890-04 Determination of sensitivity of microorganisms to antibacterials. Moscow: Federal Center for State Sanitary and Epidemiological Surveillance of the Ministry of Health of Russia. 2004. 91 p. Available at: https://fcgje.ru/download/elektronnaya_baza_metod_dokum/muk_1890-04.pdf. (in Russ.)

18. EUCAST Clinical breakpoints – bacteria v.10.0. Available at: <https://iacmac.ru/ru/docs/eucast/eucast-clinical-breakpoints-bacteria-10.0-rus.pdf>. (in Russ.)

19. Bezborodova N. A., Isakova M. N., Ryaposova M. V., Sokolova O. V. Analysis of the antibiotic resistance genes of microorganisms in the milk of cows and goats. *Reproduction in Domestic Animals*. 2019; 54 (S3):104. DOI: 10.1111/rda.13528.

20. Ingti B., Paul D., Maurya A. P., Bora D., Chanda D. D., Chakravarty A., Bhattacharjee A. Occurrence of *bla*DHA-1 mediated cephalosporin resistance in *Escherichia coli* and their transcriptional response against cephalosporin stress: a report from India. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2017; 16 (1): 13. DOI: 10.1186/s12941-017-0189-x.

21. ECDC. The bacterial challenge: time to react. Stockholm. 2009. 42 p. DOI: 10.2900/2518.

22. Kuz'mina A. V., Asetskaia I. L., Polivanov V. A., Zyryanov S. K. Medication errors associated with carbapenems. *Kachestvennaya klinicheskaya praktika = Good Clinical Practice*. 2016; 4: 48–53. eLIBRARY ID: 29246908. (in Russ.)

23. Makavchik S. A., Krotova A. L., Bargman J. E., Sukhinin A. A., Prikhodko E. I. Resistance mechanisms of bacterial isolates from cattle to antibiotics. *Issues of Legal Regulation in Veterinary Medicine*. 2020; 4: 41–46. DOI: 10.17238/issn2072-6023.2020.4.41. (in Russ.)

Поступила в редакцию / Received 12.08.2021

Доработана после рецензирования / Revised 23.09.2021

Принята к публикации / Accepted 12.10.2021

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Исакова Мария Николаевна, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник отдела репродуктивных технологий ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия.

Соколова Ольга Васильевна, доктор ветеринарных наук, старший научный сотрудник лаборатории геномных исследований и селекции животных ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия.

Безбородова Наталья Александровна, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник отдела ветеринарно-лабораторной диагностики с испытательной лабораторией ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия.

Кривоногова Анна Сергеевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологических технологий ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия.

Исаева Альбина Геннадьевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела эпизоотологического мониторинга и прогнозирования инфекционных болезней ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия.

Зубарева Владлена Дмитриевна, старший специалист лаборатории геномных исследований и селекции животных ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия.

Mariya N. Isakova, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Department of Reproductive Technologies, FSBSI UrFASRC UrB of RAS, Ekaterinburg, Russia.

Olga V. Sokolova, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Animal Genomics and Selection, FSBSI UrFASRC UrB of RAS, Ekaterinburg, Russia.

Natalia A. Bezborodova, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Department of Veterinary Laboratory Diagnosis with Testing Laboratory, FSBSI UrFASRC UrB of RAS, Ekaterinburg, Russia.

Anna S. Krivonogova, Doctor of Science (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Biological Technology, FSBSI UrFASRC UrB of RAS, Ekaterinburg, Russia.

Albina G. Isaeva, Doctor of Science (Biology), Leading Researcher, Department of Epizootological Monitoring and Prognosis of Animals' Infectious Diseases, FSBSI UrFASRC UrB of RAS, Ekaterinburg, Russia.

Vladlena D. Zubareva, Senior Specialist, Laboratory of Animal Genomics and Selection, FSBSI UrFASRC UrB of RAS, Ekaterinburg, Russia.



Изучение резистентности патогенных и условно-патогенных грибов к противогрибковым препаратам

А. Д. Козлова¹, С. П. Яцентюк², В. В. Соколов³, М. Г. Маноян⁴

ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»), г. Москва, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0002-4793-2345>, e-mail: adkozlova@vgnki.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-4819-2131>, e-mail: pcr-lab@vgnki.ru

³ <https://orcid.org/0000-0001-6309-9093>, e-mail: v.sokolov@vgnki.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0001-6347-413X>, e-mail: mycology@vgnki.ru

РЕЗЮМЕ

Широкое применение антимикотических средств для терапии микозов у человека и животных вызывает беспокойство медицинских и ветеринарных специалистов в связи с возникновением резистентности патогенных и условно-патогенных грибов к противогрибковым препаратам. За последние годы накоплена информация о различных молекулярных механизмах, лежащих в основе данного явления, однако для успешного прогнозирования резистентности в различных группах грибов необходимо провести углубленные исследования. Для терапии и профилактики грибковых заболеваний активно применяются несколько групп препаратов, среди которых наиболее часто используют азолы и аллиламины, что приводит к накоплению резистентности патогенных и условно-патогенных грибов к этим противогрибковым средствам. В работе представлены результаты использования молекулярно-генетических методов для выявления устойчивых к азолам изолятов *Candida albicans* и устойчивых к тербинафину изолятов грибов рода *Trichophyton*. Анализ нуклеотидных последовательностей гена *ERG11* 10 изолятов *Candida albicans*, выделенных от разных видов животных, позволил разделить фенотипически устойчивые и чувствительные штаммы, однако не дал возможности дифференцировать штаммы, обладающие дозозависимой устойчивостью к азолам. Изучение однонуклеотидных полиморфизмов в гене *SQLE*, ассоциированном с развитием устойчивости к тербинафину, у 12 изолятов грибов рода *Trichophyton* не позволило разделить их по резистентности, что, вероятно, связано с действием другого механизма устойчивости, который может наблюдаться у данных штаммов. Полученные результаты исследований служат основанием для использования молекулярно-генетических методов для характеристики грибов рода *Candida* и *Trichophyton*, однако, с учетом биологических особенностей патогенов разных групп, для прогнозирования резистентности целесообразно использовать несколько значимых участков генома или результаты полногеномного секвенирования, а также анализ экспрессии генов.

Ключевые слова: антимикотическая устойчивость, *Candida*, *Trichophyton*, азолы, тербинафин, полимеразная цепная реакция, секвенирование

Благодарности: Работа выполнена при поддержке Россельхознадзора в рамках научно-исследовательской работы по теме «Оценка распространенности микозов животных и рисков возникновения резистентности к антимикотическим средствам». Авторы выражают благодарность сотрудникам отделения биотехнологии Л. Э. Саканяну и А. В. Путинцевой за техническую помощь при проведении исследований.

Для цитирования: Козлова А. Д., Яцентюк С. П., Соколов В. В., Маноян М. Г. Изучение резистентности патогенных и условно-патогенных грибов к противогрибковым препаратам. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (1): 20–26. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-20-26.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Яцентюк Светлана Петровна, кандидат биологических наук, заведующий отделом генодиагностики инфекционных болезней животных отделения биотехнологии ФГБУ «ВГНКИ», 123022, Россия, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5, e-mail: pcr-lab@vgnki.ru.

Study of resistance of pathogenic and opportunistic fungi to antimycotics

A. D. Kozlova¹, S. P. Yatsentyuk², V. V. Sokolov³, M. G. Manoyan⁴

FSBI "The Russian State Centre for Quality and Standardization of Veterinary Drugs and Feed" (FSBI "VGNKI"), Moscow, Russia

¹ <https://orcid.org/0000-0002-4793-2345>, e-mail: adkozlova@vgnki.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-4819-2131>, e-mail: pcr-lab@vgnki.ru

³ <https://orcid.org/0000-0001-6309-9093>, e-mail: v.sokolov@vgnki.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0001-6347-413X>, e-mail: mycology@vgnki.ru

SUMMARY

The widespread use of antimycotic agents for the treatment of mycoses in humans and animals is of concern to medical and veterinary specialists due to the emergence of resistance of pathogenic and opportunistic fungi to antifungal agents. In recent years, information has been accumulated on the various molecular mechanisms underlying this phenomenon, but in-depth studies are needed to successfully predict resistance in various groups of fungi. To treat and prevent fungal

infections several groups of antimycotics are used, where azoles and allylamines are the most frequent ones, which leads to resistance development in pathogenic and opportunistic fungi. The article presents the results of molecular methods identification of azole-resistant *Candida albicans* isolates and terbinafine-resistant *Trichophyton* isolates. The analysis of gene *ERG11* nucleotide sequences of 10 *Candida albicans* isolates, recovered from different animal species, enabled the division of phenotypically resistant and susceptible strains, but could not differentiate between the strains, which have dose-dependent resistance to azoles. Study of single nucleotide polymorphisms in gene *SOLE*, associated with the resistance development to terbinafine in 12 fungal isolates of genus *Trichophyton*, did not allow grading them by their resistance, which is likely associated with another resistance mechanism, which can be observed in these strains. The results obtained can serve as a basis for the use of molecular methods to characterize fungi of *Candida* and *Trichophyton* genera, however, taking into account the biological features of pathogens from different groups it is reasonable to use several significant genome regions or the results of the whole genome sequencing, as well as the gene expression analysis for successful forecasting of potential resistance.

Keywords: antimycotic resistance, *Candida*, *Trichophyton*, azoles, terbinafine, polymerase chain reaction, sequencing

Acknowledgements: The work was supported by the Rosselkhoznadzor as part of the research activities on the topic "Assessment of the animal mycoses spread and the risks of resistance to antimycotics". The authors express their gratitude to the staff members of the Department of Biotechnology L. E. Sakanyan and A. V. Putintseva for the technical support.

For citation: Kozlova A. D., Yatsentyuk S. P., Sokolov V. V., Manoyan M. G. Study of resistance of pathogenic and opportunistic fungi to antimycotics. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (1): 20–26. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-20-26.

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

For correspondence: Svetlana P. Yatsentyuk, Candidate of Science (Biology), Head of the Department of Genodiagnostics of Infectious Animal Diseases, Department of Biotechnology, FSBI "VGNKI", 123022, Russia, Moscow, Zvenigorodskoye shosse, 5, e-mail: pcr-lab@vgnki.ru.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы отмечается беспрецедентный рост устойчивости паразитирующих грибов, вызывающих у людей тяжелые заболевания, к антимикотическим средствам. В группе риска прежде всего люди с ослабленным иммунитетом. Международные организации призвали увеличить интенсивность работ по исследованию и борьбе с резистентностью к противогрибковым препаратам, в том числе и в ветеринарной сфере. Распространение в популяции устойчивых штаммов является серьезной проблемой, поскольку некоторые социально значимые грибковые инфекции передаются от животных к человеку и наоборот.

Применение противогрибковых препаратов для терапии микозов у животных в Российской Федерации носит стихийный характер и не контролируется. Данный факт, безусловно, вносит свой вклад в развитие резистентности патогенных и условно-патогенных грибов к антимикотикам.

Предполагается, что широкое использование противогрибковых средств является фактором, способствующим развитию лекарственной устойчивости [1, 2]. В связи с этим резистентность грибов к антимикотическим препаратам становится серьезной проблемой мирового масштаба.

Существующие в настоящее время варианты противогрибковых препаратов представлены несколькими классами веществ, отличающимися как по химическому составу, так и по механизму действия (табл. 1).

Препараты воздействуют на плазматическую мембрану, клеточную стенку, нуклеиновые кислоты и процесс деления клеток гриба. Чаще всего в медицине и ветеринарии в настоящее время применяют препараты нескольких групп – это азолы (например, флуконазол, вориконазол и позаконазол) и аллиламины (например, тербинафин), используемые для терапии и профилактики микозов, вызванных грибами родов *Candida*, *Mi-*

crosporum и *Trichophyton*. К этим препаратам, как следствие, наиболее часто и развивается устойчивость [1, 3].

Устойчивость грибов рода *Candida* к азолам формируется в основном за счет следующих механизмов: изменения мишени, на которую действует лекарственное средство, снижения межклеточной концентрации целевого фермента, изменения пути биосинтеза стерола, сверхэкспрессии мишени противогрибкового лекарственного средства, усиленного оттока лекарственного препарата из клетки. Специфической мишенью азолов является цитохром P450-зависимый фермент ланостерин-14 α -деметилаза, кодируемый геном *ERG11* у дрожжеподобных грибов. Продукт этого гена катализирует окислительное удаление 14 α -метильной группы из ланостерола. Связывание азола с фрагментом трехвалентного железа в сайте связывания гема блокирует естественный субстрат фермента – ланостерин, нарушая биосинтетический путь [4]. Аминокислотные замены в мишени, на которую действует лекарственный препарат, являются распространенным механизмом устойчивости к азолам у *Candida*. Сообщалось о более чем 140 заменах у устойчивых штаммов, многие из которых обладают аддитивным действием [5]. Наиболее часто изменения у *C. albicans* происходят в двух позициях: R467K и G464S, рядом с сайтом связывания гема [5, 6].

Согласно литературным данным, среди азолустойчивых клинических изолятов *C. albicans* обычна сверхэкспрессия *ERG11* [7–9]. Это напрямую способствует резистентности, поскольку увеличение численности мишеней требует большего количества препарата для ингибирования [8], снижая восприимчивость. О сверхэкспрессии *ERG11* также сообщалось для резистентных к азолам изолятов других видов *Candida* – *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* и *C. krusei* [10–14]. Механизм данной сверхэкспрессии и ее вклад в устойчивость к азолам у этих видов остаются в значительной степени неизвестными.

Таблица 1

Классификация основных противогрибковых препаратов (по А. К. Sahoo et al.) [3]

Table 1

Classification of major antifungals (according to A. K. Sahoo et al.) [3]

Группа	Примеры	Механизм действия
Полиены	нистатин, леворин, натамицин, амфотерицин В	Фунгистатическое и фунгицидное действие, обусловленное связыванием препарата с эргостеролом мембраны гриба, приводящим к нарушению ее целостности
Азолы: Имидазолы Триазолы	кетоконазол, клотримазол, миконазол, бифоназол, эконазол, изоконазол, оксиконазол итраконазол, флуконазол, вориконазол, позаконазол, равуконазол, прамиконазол, альбаконазол	Фунгистатическое (реже – фунгицидное) действие, связанное с ингибированием 14 α -деметилазы, катализирующей превращение ланостерола в эргостерол мембраны
Аллиламины	тербинафин, бутенафин, нафтифин	Фунгицидное действие, связанное с нарушением синтеза эргостерола. В отличие от азолов аллиламины блокируют более ранние стадии биосинтеза, ингибируя фермент скваленэпоксидазу
Эхинокандины	каспофунгин, анидулафунгин, микафунгин, аминокандин	Фунгистатическое и фунгицидное действие, связанное с нарушением синтеза 1,3- β -D-глюкана клеточной стенки
Пиримидины	флуцитозин	Фунгистатическое и фунгицидное действие, связанное с нарушением синтеза нуклеиновых кислот/белка
Производные сордарина	GR135402, GM237354	
Препараты разных групп		
	гризеофульвин	Фунгистатический эффект, вызванный ингибированием митотической активности клеток в метафазе и нарушением синтеза ДНК
	аморолфин	Фунгистатическое и фунгицидное действие, обусловленное нарушением структуры клеточной мембраны грибов
	никкомицин	Фунгистатическое и фунгицидное действие, обусловленное нарушением синтеза хитина

Наиболее распространенный механизм устойчивости грибов – это активация мембранных насосов оттока, которые распознают различные химические вещества и обеспечивают множественную лекарственную устойчивость. У грибов есть несколько разных систем оттока лекарств, которые кодируются по меньшей мере десятью различными генами. Мутации в каждом из них также могут влиять на степень устойчивости патогена к лекарственному препарату. Кроме того, с устойчивостью к азолам связаны множественные геномные изменения, включая потерю гетерозиготности определенных областей генома, увеличение числа копий хромосом, а также сегментарные или хромосомные анеуплоидии [15]. Потеря гетерозиготности является обычной для областей, содержащих гены, являющиеся детерминантами устойчивости к азолам, включая *ERG11*. Анализ изолятов *C. albicans*, у которых развивалась устойчивость, показал, что мутации в генах часто возникают в гетерозиготном состоянии, которые затем переходят в гомозиготное состояние [16]. Распространенность анеуплоидий в изолятах, устойчивых к азолам, сделала актуальным вопрос о том, можно ли воздействием азолов объяснить отбор более устойчивых анеуплоидных вариантов или же это воздействие способствует образованию анеуплоидий. Было обнаружено, что воздействие азолов вызывает aberrантную регуляцию клеточного цикла у *C. albicans* с тетраплоидным промежуточным соединением, предшествующим образованию анеуплоидии [17].

Надо сказать, что в настоящее время при изучении механизмов устойчивости к азолам наиболее широко

используется анализ уровня экспрессии генов. Методика заключается в сравнении уровня экспрессии определенных генов у азолчувствительных и азолустойчивых штаммов. Однако для проведения этого анализа необходимо иметь свежие культуры *C. albicans*, выращенные на питательной среде в одинаковых условиях.

Таким образом, развитие устойчивости к азолам является сложным процессом, затрагивающим разные биохимические процессы и комбинации генов.

Другой группой препаратов, устойчивость к которым развивается наиболее часто, являются аллиламины. Среди ее представителей наиболее активно используется тербинафин, применяемый во всем мире для лечения многих заболеваний, вызываемых разными видами грибов-дерматофитов. Мишенью тербинафина является фермент скваленэпоксидаза (SQLE), который участвует в биосинтезе эргостерина, катализируя эпоксилирование сквалена до 2,3-оксидосквалена. Тербинафин подавляет активность скваленэпоксидазы, что приводит к истощению эргостерола и накоплению сквалена [18]. Мутации в гене SQLE, которые вызывают аминокислотные замены, приводят к структурным изменениям и снижению связывания тербинафина с белком, не провоцируя дисфункции в биосинтезе эргостерола [19].

Механизм устойчивости к данному аллиламину среди видов *Trichophyton* приписывают однонуклеотидным полиморфизмам (SNP) в гене SQLE. Точечные мутации в гене SQLE приводят к замене аминокислот в одном из четырех положений (Leu³⁹³, Phe³⁹⁷, Phe⁴¹⁵,

His⁴⁴⁰), что соответствует повышенным значениям минимальной ингибирующей концентрации (МИК) для тербинафина *in vitro* [20]. Напротив, новые миссен-мутации, приводящие к заменам H440Y/F484Y и I121M/V237I в гене *SQL*E, были зарегистрированы в изолятах с низким уровнем устойчивости [21].

Yamada T. et al. в своем исследовании оценили 2056 изолятов *T. rubrum* и *T. interdigitale* на предмет их чувствительности к тербинафину. Авторы установили, что только 17 из них (менее 1%) были устойчивы к данному противогрибковому средству. Анализируя последовательность гена *SQL*E, они обнаружили точечные мутации в четырех положениях, ответственных за устойчивый фенотип. Помимо L393F и F397L, было идентифицировано семь новых мутаций, включая одну в остатке L393 и две в остатке F397. Эти мутации исследовали путем экспрессии соответствующих аминокислотных замен с использованием *T. mentagrophytes* как организма-реципиента. Штаммы, несущие мутировавшие гены, были менее восприимчивы к тербинафину. При этом глобальный анализ экспрессии генов не выявил других значимых различий между мутировавшими и контрольными штаммами, это указывает на то, что повышенная устойчивость к тербинафину была вызвана мутациями [20].

Целью работы было оценить возможность выявления устойчивых к азолам штаммов *C. albicans* и резистентных к тербинафину штаммов *Trichophyton* spp. молекулярно-генетическими методами без оценки уровня экспрессии определенных генов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы 10 изолятов *C. albicans*, выделенных от крупного рогатого скота (КРС) и собак, изоляты *T. interdigitale*, *T. rubrum*, выделенные из ногтей пластин людей с признаками онихомикозов, *T. verrucosum* – из шерсти КРС и *T. mentagrophytes* – из шерсти собак с признаками дерматомикоза.

Чувствительность (МИК) *C. albicans* к флуконазолу (FLU), итраконазолу (ITR) и вориконазолу (VRC) определяли в соответствии с EUCAST E.Def 7.3.2 [22]. Интерпретацию МИК осуществляли в соответствии с Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents, version 10.0, 2020 (FLU: МИК более 4,0 мг/л – устойчивый, от 2,0 до 4,0 мг/л – дозозависимый, менее 2,0 мг/л – чувствительный; ITR: МИК более 0,06 мг/л – устойчивый, менее 0,06 мг/л – чувствительный; VRC: МИК более 0,25 мг/л – устойчивый, от 0,06 до 0,25 мг/л – дозозависимый, менее 0,06 мг/л – чувствительный) [23].

Оценка изолята как устойчивого или чувствительного к азолам проводилась по следующей схеме: изолят, устойчивый к трем препаратам, считали устойчивым; изолят, устойчивый или показавший промежуточную устойчивость к одному или двум препаратам, считали дозозависимым; изолят, чувствительный ко всем препаратам, считали чувствительным к азолам.

Данные об изолятах *C. albicans*, их чувствительности к азоловым препаратам, интерпретация чувствительности приведены в таблице 2.

Чувствительность *Trichophyton* к тербинафину (ТБФ) определяли по методике, разработанной в отделе микологии ФГБУ «ВГНКИ» на основе EUCAST E.Def 9.3.1 [24]. Интерпретация чувствительности осуществлялась на основании диапазонов МИК для тербинафина (мг/л):

более 32 мг/л – устойчивый, от 16 до 32 мг/л – дозозависимый, менее 16 мг/л – чувствительный.

Данные об изолятах *T. verrucosum*, *T. mentagrophytes*, *T. interdigitale* и *T. rubrum*, их чувствительности к противогрибковым препаратам и интерпретация чувствительности приведены в таблице 3.

Экстракцию ДНК проводили с помощью коммерческого набора «ДНК-сорб-С-М», амплификацию – с использованием реагентов производства АмплиСенс® (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) на приборе «Терцик» (ООО «ДНК-Технология», Россия).

Для амплификации ДНК *C. albicans* использовали праймеры, описанные ранее М.-К. Lee et al. [25]. Для выявления устойчивости *Trichophyton* к тербинафину использовали праймеры для амплификации информативного участка гена *SQL*E, выбранные в данной работе: Tr-terb-F 5'-CTTAGTCCAGAGGCCGTACC-3' и Tr-terb-R 5'-AGGATGACCTGCAGGCAGT-3'. Условия полимеразной цепной реакции для изолятов *Trichophyton*: один цикл при 95 °С в течение 5 мин, затем 42 цикла при 95 °С в течение 10 сек., 60 °С в течение 10 сек., 72 °С в течение 10 сек., затем один цикл при 72 °С в течение 1 мин.

Секвенирование фрагментов амплификации по Сенгеру выполняли методом cycle sequence с набором ABI PRISM Big Dye v.1.1 (Applied Biosystems, США) согласно инструкции изготовителя с использованием капиллярного автоматического секвенатора ABI-3100 PRISM Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Анализ полученных хроматограмм проводили с помощью программного обеспечения Chromas. Нуклеотидные последовательности анализировали с помощью программы Vector NTI Advance 11.5.0.

Полученные нуклеотидные последовательности фрагментов генома *C. albicans* сравнивали с последовательностью X13296 из базы данных GenBank, которая в статье М.-К. Lee et al. [25] была признана стандартной для изолята, чувствительного к флуконазолу.

Таблица 2
Информация об изолятах *Candida albicans*, использованных в работе
Table 2
Data on *Candida albicans* isolates, used in the work

Изолят	Источник	Минимальная ингибирующая концентрация, мг/л			Интерпретация
		FLU	ITR	VRC	
<i>C. albicans</i> № 1	КРС, вымя	4,0	0,125	0,5	устойчивый
<i>C. albicans</i> № 2	КРС, вымя	4,0	0,125	0,5	устойчивый
<i>C. albicans</i> № 3	КРС, вымя	8,0	0,25	0,5	устойчивый
<i>C. albicans</i> № 4	КРС, молоко	8,0	0,125	0,5	устойчивый
<i>C. albicans</i> № 5	стоматит, собака	4,0	0,125	0,5	устойчивый
<i>C. albicans</i> № 6	стоматит, собака	1,0	0,03	0,03	чувствительный
<i>C. albicans</i> № 7	КРС, молоко	2,0	0,06	0,25	дозозависимый
<i>C. albicans</i> № 8	КРС, вымя	2,0	0,06	0,25	дозозависимый
<i>C. albicans</i> № 9	КРС, вымя	1,0	0,03	0,03	чувствительный
<i>C. albicans</i> № 10	КРС, молоко	2,0	0,06	0,125	дозозависимый

Полученные нуклеотидные последовательности фрагмента генома *Trichophyton* анализировали на наличие точечных мутаций, ответственных за аминокислотные замены Leu393Phe, Leu393Ser (нуклеотидная позиция в гене SQLE 1177), Phe397Leu, Phe397Ile, Phe397Val (нуклеотидная позиция в гене SQLE 1189), Phe415Ile, Phe415Ser, Phe415Val (нуклеотидная позиция в гене SQLE 1305), His440Tyr (нуклеотидная позиция в гене SQLE 1380) [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ устойчивости *C. albicans* к азолам. Нуклеотидные последовательности гена *ERG11* были получены для всех 10 изолятов *C. albicans*. Оценку устойчивости *C. albicans* к препаратам азолового ряда проводили на основе анализа как нуклеотидных, так и аминокислотных последовательностей гена *ERG11*.

Полученные результаты сравнения нуклеотидных последовательностей изолятов с референтной последовательностью представлены в таблице 4.

Замены только в 10 из 30 анализируемых нуклеотидных позиций в гене *ERG11* приводят к изменениям в аминокислотной последовательности. Среди изученных изолятов *C. albicans* у чувствительных к азолам изолятов № 6 и 9 не наблюдали аминокислотных замен в данном участке гена, у четырех из пяти замены в последовательности аминокислот наблюдались в 2 из 10 позиций. Наиболее информативными были позиции **D116E** и **E266D**.

Как видно из таблицы 4, полученные данные в целом соответствуют заявленной фенотипической

устойчивости штаммов. Интересно, что даже единичная аминокислотная замена в гене *ERG11*, выявленная у изолята № 1, оказалась ассоциирована с развитием устойчивости к препаратам азолового ряда. Однако в исследовании не смогли дифференцировать полностью устойчивые штаммы и штаммы, обладающие дозозависимой устойчивостью к азолам. В изолятах с дозозависимой устойчивостью также были выявлены 2 замены: одна в позиции **E266D**, другая, у изолятов № 8 и 10 в гетерозиготном состоянии, в позиции **Q474K**.

Marichal P. et al. в своей работе [26] идентифицировали три «горячие точки» в аминокислотной последовательности гена *ERG11* на основе компиляции мутаций *ERG11*, которые, как сообщается, связаны с устойчивостью к азолам. Эти точки включают аминокислотные области 105–165, 266–287 и 405–488. Найденные нами нуклеотидные замены попадают в данные «горячие точки», что может служить подтверждением достоверности полученных результатов.

Анализ устойчивости *Trichophyton spp.* к тербинафину. В данной работе были выбраны праймеры для амплификации и последующего секвенирования фрагмента гена SQLE длиной 440 п. н., включающего все позиции однонуклеотидных замен, приводящих к развитию устойчивости к тербинафину. Были проанализированы 12 изолятов *Trichophyton* как устойчивых, так и чувствительных к тербинафину, по данным микологических исследований.

В результате анализа полученных хроматограмм и построения множественного выравнивания с помощью программного обеспечения Vector NTI Advance 11.5.0 все изоляты были идентифицированы как тербинафинчувствительные. В двух изолятах из 12 обнаружена точечная мутация в позиции 1177 (замена ТТА на СТА), однако она не является значимой и не ведет к замене аминокислоты.

Расхождение данных по устойчивости к тербинафину, полученных молекулярно-генетическими и культуральными методами, можно объяснить дополнительными механизмами устойчивости, которые могут наблюдаться у штаммов. Эта гипотеза подтверждается многочисленными исследованиями устойчивости грибов к антимикотическим средствам. Например, резистентность к азолам клинических изолятов *C. albicans* связывают с несколькими механизмами, включая миссенс-мутации в *ERG11* и сверхэкспрессию генов, кодирующих белки-переносчики нескольких лекарственных препаратов. Комбинированные эффекты таких механизмов наблюдались в одном и том же клиническом изоляте, устойчивом к азолам [27]. Возможно, что сверхэкспрессия генов, кодирующих эффлюксные насосы, также участвует в толерантности к тербинафину у исследованных нами изолятов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Широкое применение соединений азолового и аллиламинового ряда при терапии и профилактике микозов способствует появлению штаммов и изолятов, устойчивых к этим противогрибковым препаратам. Определение устойчивости традиционно проводят культуральными методами, однако для отдельных видов грибов, имеющих значение в ветеринарии, отсутствуют стандарты и контрольные точки, по которым изоляты классифицируются как чувствительные или устойчивые, что затрудняет интерпретацию кли-

Таблица 3
Информация об изолятах дерматофитов, использованных в работе

Table 3
Data on dermatophyte isolates, used in the work

№ п/п	Изолят	Источник	Минимальная ингибирующая концентрация ТВФ, мг/л	Интерпретация
1	<i>T. verrucosum</i> № 1	шерсть КРС	16	дозозависимый
2	<i>T. verrucosum</i> № 2	шерсть КРС	16	дозозависимый
3	<i>T. verrucosum</i> № 3	шерсть КРС	16	дозозависимый
4	<i>T. verrucosum</i> № 4	шерсть КРС	16	дозозависимый
5	<i>T. mentagrophytes</i> № 1	шерсть собаки	64	устойчивый
6	<i>T. mentagrophytes</i> № 2	шерсть собаки	32	дозозависимый
7	<i>T. mentagrophytes</i> № 3	шерсть собаки	32	дозозависимый
8	<i>T. interdigitale</i> № 1	ногти человека	64	устойчивый
9	<i>T. interdigitale</i> № 2	ногти человека	64	устойчивый
10	<i>T. interdigitale</i> № 3	ногти человека	64	устойчивый
11	<i>T. interdigitale</i> № 4	ногти человека	8	чувствительный
12	<i>T. interdigitale</i> № 5	ногти человека	16	дозозависимый
13	<i>T. rubrum</i> № 1	ногти человека	64	устойчивый
14	<i>T. rubrum</i> № 2	ногти человека	64	устойчивый
15	<i>T. rubrum</i> № 3	ногти человека	64	устойчивый

Таблица 4
Аминокислотные и нуклеотидные замены в гене *ERG11* у штаммов *C. albicans*

Table 4
Amino acid and nucleotide substitutions in *ERG11* gene of *C. albicans* strains

Аминокислотная замена	Референтный нуклеотид в X13296	Изоляты <i>C. albicans</i>									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		R	R	R	R	R	S	M	M	S	M
F105F	T	C	C	C	C	C	.	C	C	.	C
D116E	T	.	A	A	A	A	.	A	.	.	.
K119K	A	.	G	G	G	G	.	G	.	.	.
K128T	A	.	.	C	.	C	.	C	.	.	.
S137S	C
K143R	A
H183H	T	C	C	C	C	C
L220L	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
E266D	A	C	C	.	C	.	.	.	C	.	C
L320L	G
V332V	T	N	C	.	C	C	C
L340L	A	.	G	.	.	G	.	G	.	.	.
K342K	A	G	G	.	G
S361S	A	G	.	.	G	.
L370L	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
F380F	T
Y401Y	T
V404I	G
P419P	T
D428D	T
V437I	G
G448G	G
F449V	T
V452V	T
V456V	T
R467K	G
Q474K	C	.	.	A	.	A	.	.	A/C	.	A/C
L480L	A	.	G	G	G	G	G/A	G	G/A	G	G/A
N490N	T	.	C	C	C	C	C/T	C	C/T	C	C/T
V509M	G

Жирным шрифтом выделены позиции, приводящие к аминокислотным заменам.

R – устойчивый к азолам; S – чувствительный к азолам; M – с дозозависимой устойчивостью.

Positions, leading to amino acid substitutions, are given in bold.

R – azole-resistant; S – azole-susceptible; M – with dose-dependent resistance.

нического воздействия минимальной ингибирующей концентрации. Актуальной задачей является поиск надежных методов выявления резистентности на основе генетического анализа. В представленной работе описаны способы выявления устойчивости *C. albicans* к азолам и дерматофитов *Trichophyton* к тербинафину с помощью анализа определенных генов. Надо отметить, что полученные на данный момент результаты свидетельствуют об ограниченной информативности ана-

лиза нуклеотидных последовательностей гена *ERG11* *C. albicans* и гена *SQL* грибов рода *Trichophyton* для прогнозирования устойчивости к антигрибковым препаратам (азолам и тербинафину соответственно). Полученную информацию о структуре данных генов можно использовать для паспортизации штаммов, однако для повышения достоверности молекулярно-генетических исследований резистентности необходимо использование в исследовании большего числа изолятов грибов,

охарактеризованных фенотипически, и включение в анализ нескольких генов, ассоциированных с антимикотической устойчивостью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Cowen L. E. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nat. Rev. Microbiol.* 2008; 6 (3): 187–198. DOI: 10.1038/nrmicro1835.
- Antonovics J., Abbate J. L., Baker C. H., Daley D., Hood M. E., Jenkins C. E., et al. Evolution by any other name: antibiotic resistance and avoidance of the E-word. *PLoS Biol.* 2007; 5 (2):e30. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050030.
- Sahoo A. K., Mahajan R. Management of tinea corporis, tinea cruris, and tinea pedis: A comprehensive review. *Indian Dermatol. Online J.* 2016; 7 (2): 77–86. DOI: 10.4103/2229-5178.178099.
- Odds F. C., Brown A. J., Gow N. A. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 2003; 11 (6): 272–279. DOI: 10.1016/s0966-842x(03)00117-3.
- Morio F., Loge C., Besse B., Hennequin C., Pape L. P. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2010; 66 (4): 373–384. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.11.006.
- Casalnuovo I. A., Di Francesco P., Garaci E. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: A review of mechanisms. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2004; 8 (2): 69–77. PMID: 15267120.
- White T. C. Increased mRNA levels of *ERG16*, *CDR1*, and *MDR1* correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41 (7): 1482–1487. DOI: 10.1128/AAC.41.7.1482.
- Franz R., Kelly S. L., Lamb D. C., Kelly D. E., Ruhnke M., Morschhauser J. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42 (12): 3065–3072. DOI: 10.1128/AAC.42.12.3065.
- Perea S., Lopez-Ribot J. L., Kirkpatrick W. R., McAttee R. K., Santillan R. A., Martinez M., et al. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45 (10): 2676–2684. DOI: 10.1128/AAC.45.10.2676-2684.2001.
- Barchiesi F., Calabrese D., Sanglard D., Falconi Di Francesco L., Caselli F., Giannini D., Giacometti A., et al. Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44 (6): 1578–1584. DOI: 10.1128/AAC.44.6.1578-1584.2000.
- Redding S. W., Kirkpatrick W. R., Coco B. J., Sadowski L., Fothergill A. W., Rinaldi M. G., et al. *Candida glabrata* oropharyngeal candidiasis in patients receiving radiation treatment for head and neck cancer. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40 (5): 1879–1881. DOI: 10.1128/JCM.40.5.1879-1881.2002.
- Vandeputte P., Larcher G., Berges T., Renier G., Chabasse D., Bouchara J. P. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49 (11): 4608–4615. DOI: 10.1128/AAC.49.11.4608-4615.2005.
- Rogers P. D., Vermitsky J. P., Edlind T. D., Hilliard G. M. Proteomic analysis of experimentally induced azole resistance in *Candida glabrata*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 58 (2): 434–438. DOI: 10.1093/jac/dkl221.
- Jiang C., Dong D., Yu B., Cai G., Wang X., Ji Y., Peng Y. Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013; 68 (4): 778–785. DOI: 10.1093/jac/dks481.
- Cowen L. E., Sanglard D., Howard S. J., Rogers P. D., Perlin D. S. Mechanisms of antifungal drug resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2014; 5 (7):a019752. DOI: 10.1101/cshperspect.a019752.
- Selmecki A., Forche A., Berman J. Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell.* 2010; 9 (7): 991–1008. DOI: 10.1128/EC.00060-10.
- Harrison B. D., Hashemi J., Bibi M., Pulver R., Bavli D., Nahmias Y., et al. A tetraploid intermediate precedes aneuploid formation in yeasts exposed to fluconazole. *PLoS Biol.* 2014; 12 (3):e1001815. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001815.
- Favre B., Ryder N. S. Characterization of squalene epoxidase activity from the dermatophyte *Trichophyton rubrum* and its inhibition by terbinafine and other antimycotic agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996; 40 (2): 443–447. DOI: 10.1128/AAC.40.2.443.
- Martinez-Rossi N. M., Bitencourt T. A., Peres N. T. A., Lang E. A. S., Gomes E. V., Quaresimin N. R., et al. Dermatophyte resistance to antifungal drugs: Mechanisms and prospectus. *Front. Microbiol.* 2018; 9:1108. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01108.
- Yamada T., Maeda M., Alshahni M. M., Tanaka R., Yaguchi T., Bon-tems O., et al. Terbinafine resistance of *Trichophyton* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017; 61 (7):e00115-17. DOI: 10.1128/AAC.00115-17.
- Saunte D. M. L., Hare R. K., Jørgensen K. M., Jørgensen R., Deleuran M., Zachariae C. O., et al. Emerging terbinafine resistance in *Trichophyton*: Clinical characteristics, squalene epoxidase gene mutations, and a reliable EUCAST method for detection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019; 63 (10):e01126-19. DOI: 10.1128/AAC.01126-19.
- Arendrup M. C., Meletiadis J., Mouton R. W., Lagrou K., Hamal P., et al. EUCAST Definitive Document E.Def 7.3.2: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. 2020. Available at: <http://www.eucast.org>.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents, version 10.0. 2020. Available at: <http://www.eucast.org/astoffungi/clinical-breakpointsforantifungals>.
- Manoyan M., Sokolov V., Gursheva A., Gabuzyan N., Panin A. P034. Sensitivity of isolated dermatophyte strains to antifungal drugs in the Russian Federation. In: 9th Trends in Medical Mycology Held on 11–14 October 2019, Nice, France, Organized under the Auspices of EORTC-IDG and ECMM. *J. Fungi.* 2019; 5 (4):95. DOI: 10.3390/jof5040095.
- Lee M.-K., Williams L. E., Warnock D. W., Arthington-Skaggs B. A. Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004; 53 (2): 217–224. DOI: 10.1093/jac/dkh040.
- Marichal P., Koymans L., Willemsens S., Bellens D., Verhaselt P., Luyten W., et al. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 α -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology (Reading)*. 1999; 145 (Pt 10): 2701–2713. DOI: 10.1099/00221287-145-10-2701.
- MacCallum D. M., Coste A., Ischer F., Jacobsen M. D., Odds F. C., Sanglard D. Genetic dissection of azole resistance mechanisms in *Candida albicans* and their validation in a mouse model of disseminated infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54 (4): 1476–1483. DOI: 10.1128/AAC.01645-09.

Поступила в редакцию / Received 14.09.2021

Доработана после рецензирования / Revised 20.10.2021

Принята к публикации / Accepted 11.11.2021

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Козлова Александра Дмитриевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела генодиагностики инфекционных болезней животных отделения биотехнологии ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия.

Яцентюк Светлана Петровна, кандидат биологических наук, заведующий отделом генодиагностики инфекционных болезней животных отделения биотехнологии ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия.

Соколов Владимир Владимирович, аспирант, научный сотрудник отдела микологии ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия.

Маноян Марина Геворковна, кандидат ветеринарных наук, заведующий отделом микологии ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия.

Aleksandra D. Kozlova, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Department for Genodiagnosics of Infectious Animal Diseases of VGNKI Department of Biotechnology, FSBI “VGNKI”, Moscow, Russia.

Svetlana P. Yatsentyuk, Candidate of Science (Biology), Head of the Department for Genodiagnosics of Infectious Animal Diseases of VGNKI, Department of Biotechnology, FSBI “VGNKI”, Moscow, Russia.

Vladimir V. Sokolov, Post-Graduate Student, Research, Department of Mycology, FSBI “VGNKI”, Moscow, Russia.

Marina G. Manoyan, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), Head of the Department of Mycology, FSBI “VGNKI”, Moscow, Russia.



Антибиотикорезистентность изолятов сальмонелл, выделенных из продуктов животного происхождения

Н. Б. Шадрова¹, О. В. Прунтова², Е. А. Корчагина³

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0001-7510-1269>, e-mail: shadrova@arriah.ru

² <https://orcid.org/0000-0003-3143-7339>, e-mail: pruntova@arriah.ru

³ e-mail: korchagina@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты изучения антибиотикорезистентности изолятов сальмонелл, полученных при исследовании образцов продуктов животноводства в лаборатории микробиологических исследований ФГБУ «ВНИИЗЖ» за период с 2019 по 2020 г. При испытании 4500 проб сырья и продукции животного происхождения было выделено 106 изолятов бактерий *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, из которых 23% были нетипируемыми, а 77% принадлежали к 17 серологическим вариантам. Среди типированных культур сальмонелл доминировали изоляты серовариантов *S. enteritidis* ($n = 37$) и *S. virchow* ($n = 9$), что согласуется с данными других авторов. Чувствительность микроорганизмов к антибактериальным препаратам определяли диско-диффузионным методом, в соответствии с рекомендациями European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Были выявлены различия в соотношении чувствительных и резистентных изолятов бактерий рода *Salmonella* разных серологических вариантов по отношению к антибиотикам десяти фармакологических групп. Наибольшее число полирезистентных изолятов отмечали у сальмонелл сероваров *S. virchow*, *S. nigeria*, *S. infantis*, *S. colindale*. Резистентные и полирезистентные изоляты сальмонелл наиболее часто выделяли из продукции птицеводства. Серовар *S. typhimurium*, который в источниках литературы определяют как полирезистентный, в представленных исследованиях был устойчив к одному или двум антимикробным препаратам. У изолятов 9 сероваров сальмонелл из 17 (65%) отмечена устойчивость к налидиксовой кислоте. Доля резистентных к данному средству изолятов *S. enteritidis* составила 97% ($n = 36$). Изоляты серовара *S. colindale* ($n = 2$) были устойчивы к 8 антимикробным препаратам, *S. papuana* ($n = 5$) – к 6 антибиотикам, а *S. agona* ($n = 3$) – к 5 антибактериальным средствам. Нетипируемые изоляты сальмонелл были резистентны к 9 антибиотикам, из которых 2 культуры проявили устойчивость к ципрофлоксацину.

Ключевые слова: *Salmonella*, серовариант, антибиотик, чувствительность, резистентность

Благодарности: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Шадрова Н. Б., Прунтова О. В., Корчагина Е. А. Антибиотикорезистентность изолятов сальмонелл, выделенных из продуктов животного происхождения. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (1): 27–34. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-27-34.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Шадрова Наталья Борисовна, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией микробиологических исследований ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: shadrova@arriah.ru.

Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates recovered from animal products

N. B. Shadrova¹, O. V. Pruntova², E. A. Korchagina³

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ <https://orcid.org/0000-0001-7510-1269>, e-mail: shadrova@arriah.ru

² <https://orcid.org/0000-0003-3143-7339>, e-mail: pruntova@arriah.ru

³ e-mail: korchagina@arriah.ru

SUMMARY

The article provides data on antimicrobial resistance (AMR) of *Salmonella* isolates recovered from animal products tested in the Laboratory for Microbiological Testing of the FGBI "ARRIAH" from 2019 to 2020. 106 isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* were recovered from 4,500 tested samples of raw materials and products of animal origin, 23% of them were untyped, and 77% belonged to 17 serological variants. Isolates of *S. enteritidis* ($n = 37$) and *S. virchow* ($n = 9$) serovariants dominated among the typed cultures of *Salmonella*, which is consistent with the data from other authors. Antimicrobial susceptibility of the microorganisms was determined in a disk diffusion test in accordance with the recommendations of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Different *Salmonella* serovars demonstrated different proportions of susceptible and resistant isolates, in terms of antibiotics from ten pharmacological groups. The largest number of polyresistant isolates was noted in *Salmonella* serovars *S. virchow*, *S. nigeria*, *S. infantis*, *S. colindale*. Both resistant and polyresistant *Salmonella* isolates were most

often isolated from poultry products. *S. typhimurium* serovar, which is referred to in literature as polyresistant, was resistant to one or two antimicrobial agents as the research demonstrates. Isolates of 9 *Salmonella* serovars out of 17 (65%) showed resistance to nalidixic acid. 97% ($n = 36$) of *S. enteritidis* isolates were resistant to this antimicrobial agent. Isolates of *S. colindale* serovar ($n = 2$) were resistant to 8 antimicrobials, *S. papuana* ($n = 5$) – to 6 antibiotics, and *S. agona* ($n = 3$) – to 5 antimicrobials. Untyped *Salmonella* isolates were resistant to 9 antibiotics, 2 cultures out of them showed resistance to ciprofloxacin.

Keywords: *Salmonella*, serovariant, antibiotic, susceptibility, resistance

Acknowledgements: The study was funded by the FGBI "ARRIAH" within the framework of "Veterinary Welfare" research work.

For citation: Shadrova N. B., Pruntova O. V., Korchagina E. A. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates recovered from animal products. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (1): 27–34. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-27-34.

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

For correspondence: Natalya B. Shadrova, Candidate of Science (Biology), Head of Microbiology Laboratory, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: shadrova@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Сальмонеллез – широко распространенная инфекция человека и животных, вызываемая различными представителями вида *Salmonella enterica* [1–3]. По данным государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в РФ в 2020 году», отмечена общая тенденция к снижению показателя заболеваемости сальмонеллезом. В 2020 г. по сравнению с 2019 г. показатель уменьшился в 1,6 раза и составил 14,71 на 100 тыс. населения [4, 5]. Несмотря на это, сальмонеллез сохраняет свою актуальность. Согласно данным референс-центра по мониторингу сальмонеллезов, в 2020 г. от заболевших людей выделяли сальмонеллы 27 серотипов, из продовольственного сырья – 17, объектов окружающей среды – 16. Как и в предыдущие годы, сальмонеллы наиболее часто выявляли в продукции птицеводства [4].

Сальмонеллы обладают чувствительностью к широкому спектру антимикробных препаратов (АМП) ввиду особенностей строения их клеточной стенки. Как грамотрицательные микроорганизмы, они чувствительны к: бета-лактамам (аминопенициллинам, карбоксипенициллинам, ингибиторозащищенным пенициллинам, цефалоспорином, монобактамам, карбапенемам), аминогликозидам (стрептомицину, канамицину, гентамицину, тобрамицину, амикацину), хинолонам (налидиксовой кислоте) и фторхинолонам (ципрофлоксацину, норфлоксацину, офлоксацину и др.), тетрациклинам (тетрациклину, доксициклину), полимиксинам, сульфаниламидам и ко-тримоксазолу, нитрофуранам (нифуроксазиду, нифурателу, фуразолидону) и препаратам других групп (фосфомицину, хлорамфениколу) [6–8].

Как следует из доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в РФ в 2020 году», в 2015–2020 гг. при выделении доминировали серотипы *S. enteritidis* (64,7%), *S. typhimurium* (4,8%) и *S. infantis* (3,2%). При изучении чувствительности к антимикробным препаратам изолятов *S. enteritidis*, выделенных в 2020 г., было установлено, что 58,7% культур резистентны к колистину, а 75% – к ципрофлоксацину. У 4,1% изолятов выявлена множественная устойчивость, а для двух культур *S. enteritidis* установлена резистентность к полимиксинам, монобактамам, пенициллинам, цефалоспорином II, III, IV поколения.

Выделенные культуры *S. infantis* в 85% случаев проявляли резистентность более чем к трем классам антибиотиков, при этом все изоляты были чувствительны к гликоциклинам, полимиксинам, карбопенемам, цефалоспорином I поколения и аминогликозидам III поколения. Около половины изолятов *S. typhimurium* были чувствительны к действию всех антимикробных препаратов, а 30% культур были резистентны к двум группам антибиотиков (пенициллины, тетрациклины) [4].

По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), половина всех производимых в мире антибиотиков используется не только для лечения людей, но и животных и птиц, продукцию от которых человек употребляет в пищу. В связи с этим количество штаммов возбудителей, резистентных к АМП, неуклонно возрастает [9].

В России, так же как в странах ЕС, США, Канады и др., проблема антимикробной резистентности приняла угрожающие масштабы, и для ее решения была разработана и утверждена Правительством РФ от 25 сентября 2017 г. № 2045-р «Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года» [10].

По данным ВОЗ, бактерии вида *S. enterica* входят в число микроорганизмов, у которых выявлены резистентные серотипы, встречающиеся в пищевой цепи [11].

В разные периоды развития ветеринарии и медицины при сальмонеллезной инфекции использовали такие АМП, как хлорамфеникол, ампициллин, ко-тримоксазол. В дальнейшем, в связи с появлением устойчивости к традиционным препаратам, для лечения сальмонеллезов стали применять фторхинолоновые препараты и цефалоспорины расширенного спектра (ЦРС) [12]. В настоящее время отмечен неуклонный рост резистентности представителей семейства *Enterobacteriaceae* к большинству антимикробных средств, применяющихся для терапии инфекционных заболеваний животных и человека. В связи с этим у бактерий, выделенных не только от больших животных, но и в образцах продуктов животного происхождения, необходимо в обязательном порядке определять чувствительность к АМП. В европейских странах и США осуществляется постоянный надзор за резистентностью микроорганизмов, в том числе и сальмонелл. В первую очередь

проводят мониторинг устойчивости к хинолонам и ЦРС, а также множественной резистентности к АМП [13, 14]. Поэтому выявление изолятов сальмонелл, резистентных к АМП, в продукции животного происхождения является актуальной проблемой.

Целью настоящей работы было определение резистентности к антибиотикам изолятов бактерий рода *Salmonella*, выделенных из сырья животного происхождения в период с 2019 по 2020 г.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы микроорганизмов. Для контроля питательных сред и методов выделения сальмонелл использовали музейные штаммы бактерий *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 и *Escherichia coli* ATCC 25922.

Изоляты бактерий. В работе использовали 106 изолятов бактерий рода *Salmonella*, полученных из образцов продуктов животного происхождения и пищевых продуктов при проведении микробиологических исследований за 2019–2020 гг.

Антибиотики. Для определения антибиотикочувствительности бактерий использовали стандартные бумажные диски со следующими антибиотиками: азитромицин (15 мкг), налидиксовая кислота (30 мкг), стрептомицин (10 мкг), тетрациклин (30 мкг), амикацин (30 мкг), амоксициллин (20 мкг), триметоприм/сульфаметоксазол (23,75/1,25 мкг), ампициллин (10 мкг), гентамицин (10 мкг), цефотаксим (30 мкг), левомицетин (30 мкг), имипенем (10 мкг), меропенем (10 мкг), ципрофлоксацин (5 мкг), канамицин (30 мкг) (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Россия).

Выделение и идентификация сальмонелл. Выделение бактерий из образцов продуктов животного происхождения и пищевых продуктов проводили согласно ГОСТ 31659-2012 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий рода *Salmonella*»¹ с применением питательных сред производства ФБУН ГНЦ ПМБ (Россия).

Для предварительного неселективного обогащения навеску продукта массой (25 ± 0,1) г, подготовленную для исследования, вносили в стерильный пакет, содержащий 225 см³ забуференной пептонной воды, и гомогенизировали в течение 1 мин. Посевы инкубировали при температуре (37 ± 1) °С в течение (18 ± 1) ч. После этапа первичного обогащения по 1 см³ образца пересевали в пробирки с 10 см³ RVS (среда Раппапорта – Вассилиадиса) и 10 см³ селенитовой среды. Посевы на RVS инкубировали при температуре (41,5 ± 1) °С, а на селенитовой среде – при (37 ± 1) °С в течение (24 ± 1) ч. После инкубирования из каждой пробирки бактериологической петлей проводили высев штрихом на поверхность двух сред: VSA (висмут-сульфитный агар) и XLD (ксилозо-лизин-дезоксихолатный агар). Посевы инкубировали при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 1) ч. Принадлежность выросших колоний к бактериям рода *Salmonella* подтверждали посредством иммуноферментного анализа с использованием экспресс-тестов Singlepath® (Merck KGaA, Германия) и анализатора mini VIDAS (bioMérieux SA, Франция).

Серологическая идентификация сальмонелл. Серологическую формулу выделенных культур *Salmonella enterica* определяли в реакции агглю-

тинации на стекле с моно- и поливалентными О- и Н-сыворотками диагностическими адсорбированными ПЕТСАЛ® (ФГУП СПбНИИВС ФМБА, Россия). Серологический вариант штамма определяли на основании серологической формулы в соответствии со схемой Кауфмана – Уайта.

Определение чувствительности к антимикробным препаратам. Идентифицированные культуры тестировали на чувствительность к АМП диско-диффузионным методом согласно МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам»² и клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам»³. Бактериальную суспензию (0,5 по стандарту мутности МакФарланда) равномерно распределяли на поверхности агара Мюллера – Кауфмана. Диски с антибиотиками наносили на поверхность инокулированного исследуемой культурой агара (не более 6 дисков на 1 чашку). После аппликации дисков чашки Петри помещали в термостат кверху дном и инкубировали при температуре (35 ± 1) °С в течение 18–24 ч.

Оценку результатов проводили по наличию зон задержки роста микроорганизмов вокруг дисков. Диаметр зон задержки роста с учетом диаметра самого диска измеряли с точностью до 1 мм.

Интерпретация и анализ результатов. Изоляты бактерий, согласно рекомендациям European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), разделяли на следующие группы: чувствительные, резистентные к одному и двум антибиотикам, полирезистентные – устойчивые к трем и более антибиотикам [15]. В группе резистентных изолятов выделяли экстремально резистентные культуры, которые были устойчивы к 6 и 7 АМП [16].

Статистическая обработка результатов. Исследования проводили в трех повторностях. Полученные данные статистически обрабатывали с использованием стандартного пакета анализа Microsoft Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В период с 2019 по 2020 г. в лаборатории микробиологических исследований ФГБУ «ВНИИЗЖ» были проведены испытания 4500 образцов продукции животного происхождения с целью выявления их контаминации бактериями рода *Salmonella*. В результате было получено 106 изолятов, идентифицированных по ростовым и биохимическим свойствам, как бактерии рода *Salmonella*, которые принадлежали к 17 серологическим вариантам из групп В, С, D, E, а 24 изолята *Salmonella enterica*, принадлежащие к серогруппам В, С и E, были нетипируемые.

Серовариантный состав изолятов. По данным литературы, ведущее положение в этиологической структуре сальмонеллезов как животных, так и человека занимает *S. enteritidis* (35%) [17–19]. В нашей работе большая часть культур (34,9%) также принадлежала к этому сероварианту. Изоляты серовара *S. virchow* были выявлены в 9 образцах (8,5%). Изоляты таких

² МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России. 2004. 91 с. Режим доступа: https://fcgje.ru/download/elektronnaya_baza_metod_dokum/muk_1890-04.pdf.

³ Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. 2018. 206 с. Режим доступа: <https://flm.kz/files/14062184925c1281c1dfd6b.pdf>.

¹ ГОСТ 31659-2012 Продукты пищевые. Методы выявления бактерий рода *Salmonella*. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200098239?marker=7D20K3>.

Таблица
Серологические варианты *Salmonella*, наиболее часто выделяемые из продуктов животного происхождения ($n = 74$)

Table
Serological variants of *Salmonella* most often recovered from animal products ($n = 74$)

Серологический вариант	Количество изолятов	Удельный вес от общего числа изолятов, выделенных из пищевых продуктов, %
<i>S. enteritidis</i>	37	34,9
<i>S. virchow</i>	9	8,5
<i>S. nigeria</i>	7	6,6
<i>S. parviana</i>	5	4,7
<i>S. infantis</i>	5	4,7
<i>S. derby</i>	4	3,8
<i>S. agona</i>	3	2,8
<i>S. colindale</i>	2	1,9
<i>S. typhimurium</i>	2	1,9

сероваров, как *S. nigeria*, *S. parviana* и *S. infantis*, были выявлены в 7 (6,6%), 5 (4,7%) и 5 (4,7%) пробах соответственно (табл.). Серотип *S. typhimurium*, клинически важный как для животных, так и для человека, был выявлен только в двух образцах, что составило 1,9%.

Нетипируемые изоляты *Salmonella enterica* subsp. *enterica* были определены в 24 образцах продукции животного происхождения, что составило 22,6%. Серовар *S. agona*, вызвавший две вспышки сальмонеллеза в 2017–2018 гг. в странах – членах ЕС, в наших исследованиях был выделен из 3 проб (2,8%) [20].

Определение чувствительности изолятов сальмонелл к антибиотикам различных фармакологических групп. При выборе АМП для изучения антибиотикорезистентности 106 изолятов бактерий рода *Salmonella* учитывали информацию о применении данных препа-

ратов в ветеринарной и медицинской практике и рекомендации EUCAST для определения чувствительности к АМП грамотрицательных микроорганизмов.

В результате проведенной работы было установлено, что изоляты сальмонелл чувствительны к 3 антибиотикам из группы аминогликозидов (амикацину – 100%, гентамицину – 100% и канамицину – 98%), к карбапенемам (имипенему – 100% и меропенему – 100%), а также к цефотаксиму – 97%. Чувствительность культур сальмонелл к левомицетину составила 92%, азитромицину – 91%, ципрофлоксацину – 90%. К ампициллину были чувствительны 87% изолятов, к стрептомицину – 84% (рис. 1).

Резистентность к налидиксовой кислоте была установлена у 74% изолятов, а к триметоприм/сульфаметоксазолу – у 45% культур.

Как показано на рисунке 2, из общего числа исследованных изолятов ($n = 106$) только 10 были чувствительны ко всем группам АМП, что составило 9%, в то время как 96 изолятов (91%) были резистентными. При этом удельный вес изолятов, устойчивых к одной группе АМП, составил 38% (40 изолятов).

Устойчивость к 2 группам антибиотиков показали 20 культур (19%). Полирезистентными, то есть устойчивыми к трем и более АМП, были 36 изолятов (34%). В этой группе выявили экстремально резистентные изоляты, устойчивые к 6 антибиотикам: ципрофлоксацину, стрептомицину, налидиксовой кислоте, цефотаксиму, левомицетину и канамицину. Экстремально резистентные изоляты, устойчивые к 7 АМП, составили 4% от общего числа полирезистентных.

Определение резистентности к АМП бактерий рода *Salmonella*, выделенных из образцов продуктов животного происхождения. Наибольшее число изолятов сальмонелл было выделено из мяса птицы (рис. 3), при этом доля резистентных культур составила 90%, включая 3 экстремально резистентных. Среди 35 изолятов, выделенных из мясных полуфабрикатов, резистентными были 32 (91%). В группе изолятов, выделенных из свинины и свиных полуфабрикатов, только один из 13 оказался чувствительным к АМП и один определен как экстремально резистентный.

Таким образом, большинство полирезистентных культур сальмонелл обнаружены в образцах мяса птицы (50%), включая экстремально резистентные, причем наибольшее количество выделенных изолятов были резистентны ко многим группам АМП. Изоляты, резистентные к амоксициллину, были выделены только из образцов свинины – 69% ($n = 9$).

Необходимо отметить, что полирезистентные изоляты сальмонелл обнаружены во всех группах продуктов животного происхождения, но в образцах говядины их количество было наименьшим.

При изучении антибиотикорезистентности 53 изолятов бактерий рода *Salmonella*, выделенных из продукции птицеводства, было установлено, что все изоляты чувствительны к трем антибиотикам группы аминогликозидов (гентамицину – 100%, амикацину – 100%, канамицину – 100%) и препаратам группы карбапенемов (меропенему – 100% и имипенему – 100%). Кроме того, была выявлена чувствительность 52 изолятов (98%) к цефотаксиму, 48 изолятов (91%) – к азитромицину и 49 изолятов (92%) – к левомицетину (рис. 4).

Резистентность к препарату группы хинолонов (налидиксовой кислоте) была отмечена у 46 изоля-

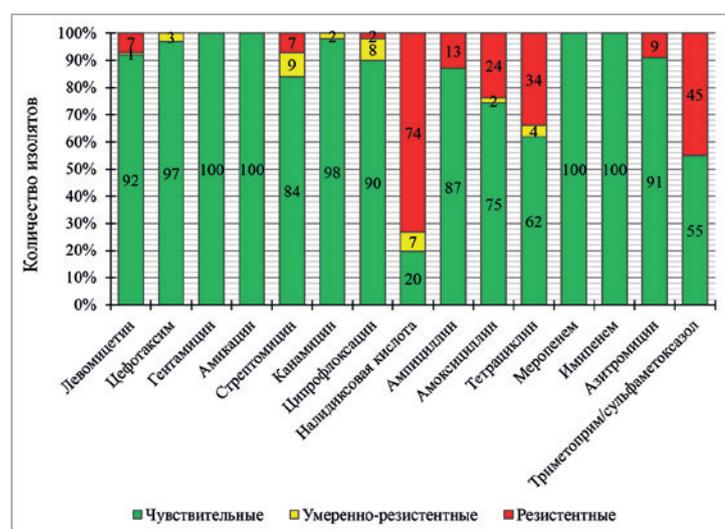


Рис. 1. Антибиотикочувствительность изолятов бактерий рода *Salmonella*, выделенных из сырья животного происхождения

Fig. 1. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates recovered from raw materials of animal origin

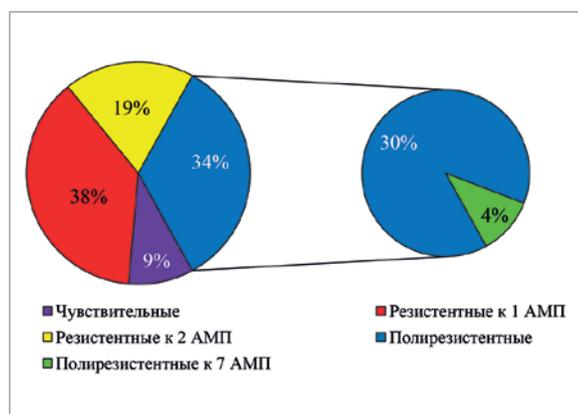


Рис. 2. Соотношение числа чувствительных и резистентных к АМП изолятов Salmonella (%)

Fig. 2. Proportion of Salmonella isolates susceptible and resistant to antimicrobials (%)

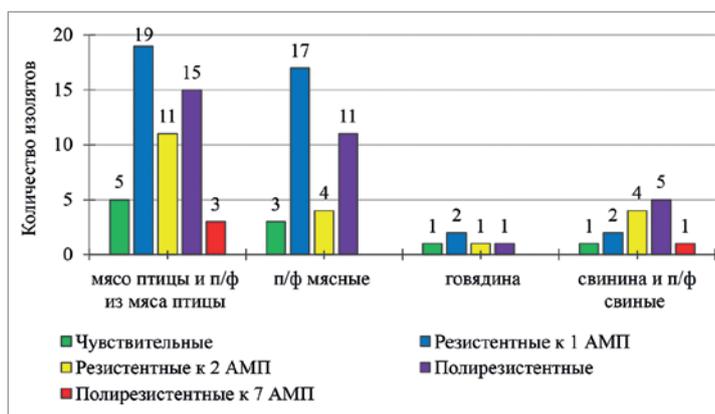


Рис. 3. Антибиотикорезистентность изолятов бактерий рода Salmonella, выделенных из образцов продуктов животного происхождения

Fig. 3. Antimicrobial susceptibility of Salmonella isolates recovered from products of animal origin

тов (87%) сальмонелл, выделенных из образцов мяса птицы, а у 2 изолятов выявлена устойчивость к фторхинолонам (ципрофлоксацину).

Анализ антибиотикорезистентности изолятов сальмонелл различных серовариантов (рис. 5) показал, что большинство изолятов серовара *S. enteritidis* являлись резистентными к 1 и 2 антибиотикам (35 изолятов – 95%), полирезистентным был только один изолят.

Наибольшее число полирезистентных изолятов было отмечено у сероваров *S. virchow* (56%), *S. nigeria* (71%), *S. infantis* (40%), а серовар *S. parviana* был представлен только полирезистентными изолятами (100%), из которых 1 культура была устойчива к 5 АМП.

Один из изолятов серовара *S. colindale* был резистентным к 7 АМП.

В ходе работы была определена устойчивость 36 изолятов (97%) серовара *S. enteritidis* к налидиксовой кислоте, которая относится к группе хинолонов и является наиболее приоритетным препаратом, входящим в перечень ВОЗ критически важных противомикробных препаратов для медицинского применения [21]. Стоит отметить что устойчивость к налидиксовой кислоте наблюдали также у изолятов *S. virchow*, *S. infantis*, *S. nigeria* и *S. parviana*.

Резистентность к амоксициллину была выявлена у 5 изолятов *S. enteritidis* (14%), триметоприму/сульфаметоксазолу – у 3 изолятов (8%) и тетрациклину – у 1 культуры (рис. 5).

Из 9 изолятов *S. virchow* все были резистентны к налидиксовой кислоте (100%), а 7 изолятов (78%) не проявили чувствительность к триметоприму/сульфаметоксазолу. Устойчивость изолятов *S. nigeria* (n = 7) к налидиксовой кислоте составила 100%, а к триметоприму/сульфаметоксазолу – 86%. У изолятов *S. parviana* (n = 5) отмечена резистентность к 6 АМП, при этом все культуры были устойчивы к триметоприму/сульфаметоксазолу. Изоляты *S. infantis* (n = 5) были резистентны к налидиксовой кислоте (4 изолята), тетрациклину (2 изолята) и триметоприм/сульфаметоксазолу (3 изолята).

Изоляты *S. agona* (n = 3) были устойчивы к амоксициллину, ампициллину, налидиксовой кислоте, стрептомицину и тетрациклину (рис. 6). Все изоляты *S. colindale* (n = 2) оказались резистентными к налидиксовой кисло-

те (100%) и еще к 7 АМП. Устойчивость двух изолятов серовара *S. typhimurium* была определена к налидиксовой кислоте и азитромицину. Нетипируемые изоляты сальмонелл не проявили чувствительность к 9 антибиотикам. При этом 2 изолята были устойчивы к ципрофлоксацину.

По данным государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году», у более чем 60% изолятов сальмонелл была установлена резистентность к АМП, из них 75% изолятов *S. enteritidis* характеризовались устойчивостью к ципрофлоксацину [4]. Как показали результаты нашего исследования, доля резистентных к антибиотикам изолятов составила 91%, при этом 97% изолятов *S. enteritidis* были устойчивы к налидиксовой кислоте.



Рис. 4. Антибиотикорезистентность изолятов бактерий рода Salmonella, выделенных из мяса птицы и полуфабрикатов из мяса птицы

1 – левомицетин, 2 – цефотаксим, 3 – гентамицин, 4 – амикацин, 5 – стрептомицин, 6 – канамицин, 7 – ципрофлоксацин, 8 – налидиксовая кислота, 9 – ампициллин, 10 – амоксициллин, 11 – тетрациклин, 12 – меропенем, 13 – имипенем, 14 – азитромицин, 15 – триметоприм/сульфаметоксазол

Fig. 4. Antimicrobial resistance of Salmonella isolates recovered from poultry meat and semi-finished poultry meat products:

1 – levomycetin, 2 – cefotaxime, 3 – gentamicin, 4 – amikacin, 5 – streptomycin, 6 – kanamycin, 7 – ciprofloxacin, 8 – nalidixic acid, 9 – ampicillin, 10 – amoxicillin, 11 – tetracycline, 12 – meropenem, 13 – imipenem, 14 – azithromycin, 15 – trimethoprim/sulfamethoxazole

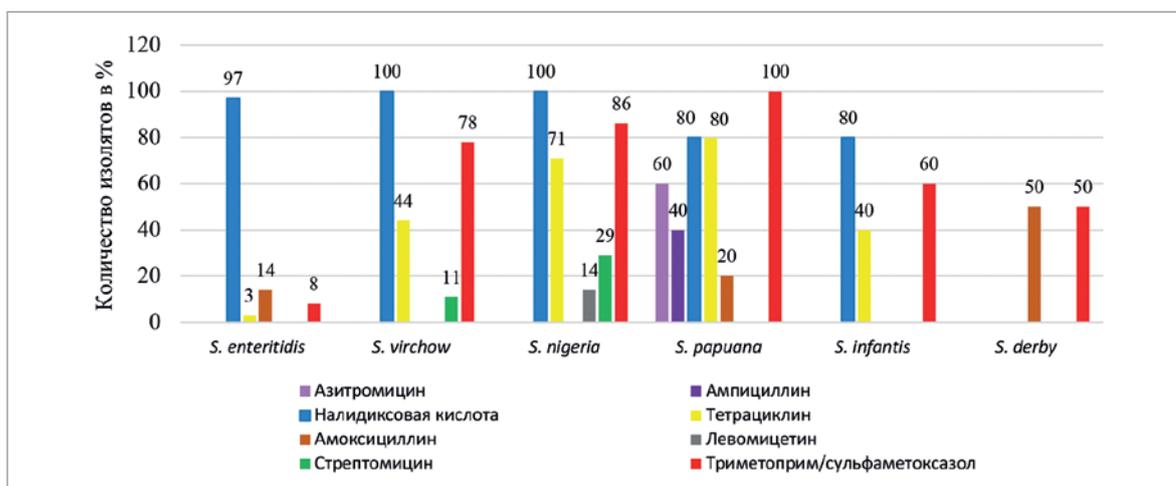


Рис. 5. Резистентность изолятов сероваров *S. enteritidis*, *S. virchow*, *S. nigeria*, *S. papuana*, *S. infantis* и *S. derby* к АМП
Fig. 5. Resistance of isolates of the following serovars *S. enteritidis*, *S. virchow*, *S. nigeria*, *S. papuana*, *S. infantis* and *S. derby* to antimicrobials

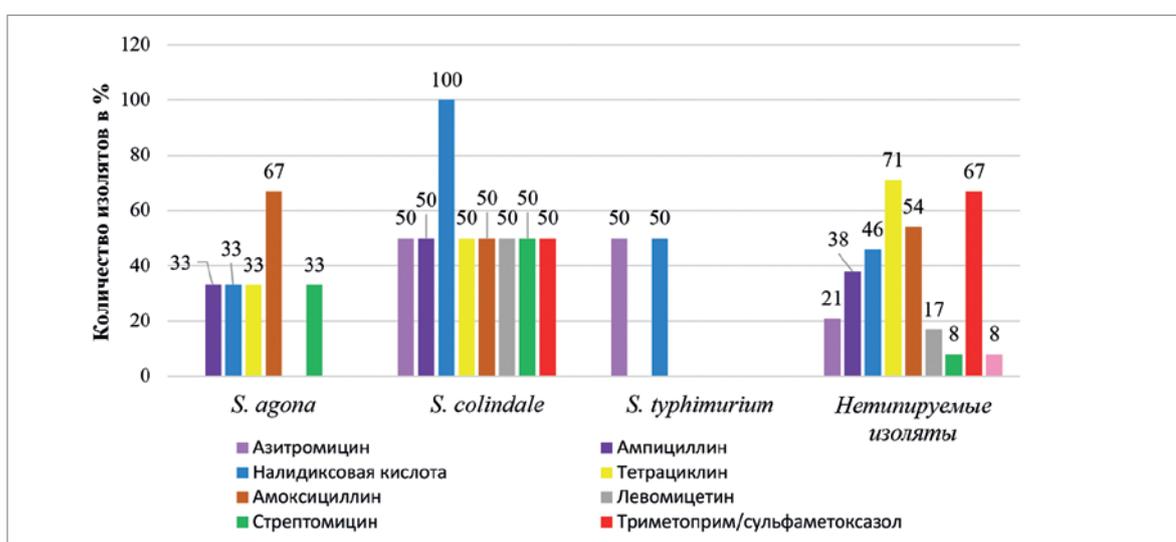


Рис. 6. Резистентность изолятов сероваров *S. agona*, *S. colindale*, *S. typhimurium* и нетипируемых культур к АМП
Fig. 6. Resistance of isolates of serovars *S. agona*, *S. colindale*, *S. typhimurium* and untyped cultures to antimicrobials

Необходимо отметить, что значительная часть изолятов сальмонелл является полирезистентными. Это согласуется с данными соответствующих отчетов стран ЕС, в которых отмечена множественная лекарственная устойчивость у монофазных вариантов *S. typhimurium* (56,7% изолятов), *S. kentucky*, *S. infantis*, *S. typhimurium* и *S. enteritidis*.

У штаммов, выделенных из пищевых продуктов, чаще отмечается множественная устойчивость к антибиотикам в отличие от штаммов, выделенных от людей (41,6% против 15,8%). Основная часть данных штаммов представлена сероварами *S. typhimurium* (более 60%) и *S. infantis* (более 80%). В целом увеличилась резистентность сальмонелл к высоким концентрациям ципрофлоксацина [22].

В 2020 г. в РФ из продукции животного происхождения наиболее часто выделяли изоляты сероварианта *S. enteritidis*, что согласуется с полученными нами данными. Из образцов мяса птицы его выделяли чаще всего (52%), на втором и третьем местах были *S. typhimurium* и *S. infantis* соответственно.

Половина изолятов *S. typhimurium* была чувствительна к действию всех антибиотиков, в то время как у 30% резистентность наблюдалась к двум классам антибактериальных препаратов (пенициллины, тетрациклины). Антибиотикорезистентность отмечали у 90% изолятов *S. infantis*, при этом резистентность к 3 и более препаратам регистрировали у 59% из них. Вместе с тем все исследованные изоляты были чувствительны к гликоциклину, полимиксиам, карбопенемам, цефалоспорином I поколения и аминогликозидам III поколения [4].

В последние годы публиковались сообщения об изолятах сальмонелл, резистентных к таким широко используемым в медицине и ветеринарии АМП, как сульфаниламиды (30,5%), тетрациклины (28,8%) и ампициллин (25,9%). Устойчивость отдельных сероваров сальмонелл к этим соединениям варьировала от низкой у *S. enteritidis* (4,5–7,8%) до высокой у монофазного варианта *S. typhimurium* (86–88%) и *S. kentucky* (71–76%) [23–27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования 4500 образцов продукции животного происхождения за период с 2019 по 2020 г. в лаборатории микробиологических исследований ФГБУ «ВНИИЗЖ» было выделено 106 изолятов бактерий *S. enterica* subsp. *enterica*. Из них 77% изолятов принадлежали к 17 серологическим вариантам, а остальные были нетипируемыми (23%). Доминировали изоляты серовариантов *S. enteritidis* ($n = 37$) и *S. virchow* ($n = 9$), что согласуется с данными других авторов.

При определении чувствительности изолятов бактерий рода *Salmonella* к АМП были выявлены различия в соотношении чувствительных и резистентных сальмонелл разных серологических вариантов по отношению к антибиотикам десяти фармакологических групп.

Установлено, что изоляты *Salmonella* всех исследуемых серовариантов чувствительны к следующим антибиотикам: амикацину (100%), гентамицину (100%), канамицину (98%), имипенему и меропенему (100%).

Резистентность изолятов сальмонелл отмечена к хинолонам (налидиксовой кислоте) – 74% и к сульфаниламидам (триметоприму/сульфаметоксазолу) – 45%. Доля изолятов, резистентных к одной группе АМП, составила 38%, а полирезистентных – 34%, включая культуры, устойчивые к 7 антибиотикам (4%).

Наибольшее число полирезистентных изолятов отмечали у сальмонелл сероваров *S. virchow*, *S. nigeria*, *S. infantis*, *S. colindale*, а серовар *S. parviana* был представлен только полирезистентными изолятами (100%).

Выделение резистентных и полирезистентных изолятов сальмонелл наиболее часто наблюдалось из продукции птицеводства. Только в мясе птицы были обнаружены культуры, резистентные к ципрофлоксацину. Изоляты сальмонелл, устойчивые к налидиксовой кислоте и триметоприму/сульфаметоксазолу, выявляли во всех группах продукции животного происхождения, при этом из мяса птицы таких изолятов было выделено максимальное количество – 87% ($n = 46$) и 40% ($n = 21$) соответственно. Изоляты, резистентные к амоксициллину, были выделены только из образцов свинины – 69% ($n = 9$).

Серовар *S. typhimurium*, который в данных литературы фигурирует как полирезистентный, в наших исследованиях был устойчив к одному или двум АМП.

У изолятов 9 сероваров была отмечена устойчивость к налидиксовой кислоте, при этом доля изолятов *S. enteritidis*, резистентных к данному средству, составила 97% ($n = 36$). Изоляты серовара *S. colindale* ($n = 2$) были устойчивы к 8 АМП, изоляты *S. parviana* ($n = 5$) – к 6 антибиотикам, изоляты *S. agona* ($n = 3$) – к 5 препаратам. Нетипируемые изоляты сальмонелл были резистентны к 9 антибиотикам, в том числе к ципрофлоксацину (2 изолята).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Callejón R. M., Rodríguez-Naranjo M. I., Ubeda C., Hornedo-Ortega R., García-Parrilla M. C., Troncoso A. M. Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the United States and European Union: trends and causes. *Foodborne Pathog. Dis.* 2015; 12 (1): 32–38. DOI: 10.1089/fpd.2014.1821.
2. ECDC. *Salmonella* the most common cause of foodborne outbreaks in the European Union. Режим доступа: <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/salmonella-most-common-cause-foodborne-outbreaks-european-union>.
3. Ehuwa O., Jaiswal A. K., Jaiswal S. *Salmonella*, food safety and food handling practices. *Foods.* 2021; 10 (5):907. DOI: 10.3390/foods10050907.
4. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 2021. 256 с. Режим доступа: https://www.rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/5fa/gd-seb_02.06-_s-podpisyu_.pdf.

5. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 2020. 299 с. Режим доступа: https://www.rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/8e4/gosdoklad-za-2019_seb_29_05.pdf.
6. Цыганова С. В. Проблема сальмонеллеза птиц – препятствие для получения биобезопасных продуктов. *Птицеводство.* 2014; 4: 43–47. eLIBRARY ID: 21593427.
7. Marchello C. S., Carr S. D., Crump J. A. A systematic review on antimicrobial resistance among *Salmonella* Typhi worldwide. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2020; 103 (6): 2518–2527. DOI: 10.4269/ajtmh.20-0258.
8. Threlfall E. J. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiol. Rev.* 2002; 26 (2): 141–148. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00606.x.
9. McEwen S. A., Collignon P. J. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiol. Spectr.* 2018; 6 (2). DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017.
10. Давыдов Д. С. Национальная стратегия Российской Федерации по предупреждению распространения устойчивости патогенных микроорганизмов к антимикробным препаратам: трудности и перспективы сдерживания одной из глобальных биологических угроз XXI века. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2018; 18 (1): 50–56. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-1-50-56.
11. ВОЗ. Новые данные свидетельствуют о росте устойчивости к противомикробным препаратам по всему миру. Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news/item/29-01-2018-high-levels-of-antibiotic-resistance-found-worldwide-new-data-shows>.
12. McDermott P. F., Zhao S., Tate H. Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *Microbiol. Spectr.* 2018; 6 (4). DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0014-2017.
13. Antimicrobial resistance monitoring results complementing the EU Overview Summary Report on AMR in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018 – Italy, 2020. DOI: 10.5281/zenodo.3636029.
14. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. *EFSA J.* 2020; 18 (3):6007. DOI: 10.2903/j.efsa.2020.6007.
15. Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам. Таблицы пограничных значений для интерпретации значений МПК и диаметров зон подавления роста. Версия 10.0, 2020. Режим доступа: <https://iacmac.ru/ru/docs/eucast/eucast-clinical-breakpoints-bacteria-10.0-rus.pdf>.
16. Magiorakos A. P., Srinivasan A., Carey R. B., Carmeli Y., Falagas M. E., Giske C. G., et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18 (3): 268–281. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
17. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA J.* 2015; 13 (1):3991. DOI: 10.2903/j.efsa.2015.3991.
18. Ferrari R. G., Rosario D. K. A., Cunha-Neto A., Mano S. B., Figueiredo E. E. S., Conte-Junior C. A. Worldwide epidemiology of *Salmonella* serovars in animal-based foods: a meta-analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 2019; 85 (14):e00591-19. DOI: 10.1128/AEM.00591-19.
19. Grimont P. A. D., Weill F. X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9th ed. Paris; 2007. Режим доступа: https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf.
20. Jourdan-da Silva N., Fabre L., Robinson E., Fournet N., Nisavanh A., Bruyand M., et al. Ongoing nationwide outbreak of *Salmonella* Agona associated with internationally distributed infant milk products, France, December 2017. *Euro Surveill.* 2018; 23 (2): 17-00852. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.2.17-00852.
21. WHO. Stop using antibiotics in healthy animals to prevent the spread of antibiotic resistance. Режим доступа: <https://www.who.int/news/item/07-11-2017-stop-using-antibiotics-in-healthy-animals-to-prevent-the-spread-of-antibiotic-resistance>.
22. Terentjeva M., Avsejenko J., Streikiša M., Utināne A., Kovajenko K., Bērziņš A. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in meat and meat products in Latvia. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2017; 24 (2): 317–321. DOI: 10.5604/12321966.1235180.
23. CIPARS. 2016 CIPARS Annual Report: Executive summary. Режим доступа: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/surveillance/canadian-integrated-program-antimicrobial-resistance-surveillance-cipars/cipars-reports/2016-annual-report-summary.html>.
24. Castro-Vargas R. E., Herrera-Sánchez M. P., Rodríguez-Hernández R., Rondón-Barragán I. S. Antibiotic resistance in *Salmonella* spp. isolated

from poultry: A global overview. *Vet. World.* 2020; 13 (10): 2070–2084. DOI: 10.14202/vetworld.2020.2070-2084.

25. Karkey A., Thwaites G. E., Baker S. The evolution of antimicrobial resistance in *Salmonella* Typhi. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2018; 34 (1): 25–30. DOI: 10.1097/MOG.0000000000000406.

26. Yang X., Huang J., Zhang Y., Liu S., Chen L., Xiao C., et al. Prevalence, abundance, serovars and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from retail raw poultry meat in China. *Sci. Total Environ.* 2020; 713:136385. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.136385.

27. Zeng Y. B., Xiong L. G., Tan M. F., Li H. Q., Yan H., Zhang L. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in pork, chicken, and duck from retail markets of China. *Foodborne Pathog. Dis.* 2019; 16 (5): 339–345. DOI: 10.1089/fpd.2018.2510.

REFERENCES

1. Callejón R. M., Rodríguez-Naranjo M. I., Ubeda C., Hornedo-Ortega R., García-Parrilla M. C., Troncoso A. M. Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the United States and European Union: trends and causes. *Foodborne Pathog. Dis.* 2015; 12 (1): 32–38. DOI: 10.1089/fpd.2014.1821.

2. ECDC. *Salmonella* the most common cause of foodborne outbreaks in the European Union. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/salmonella-most-common-cause-foodborne-outbreaks-european-union>.

3. Ehuwa O., Jaiswal A. K., Jaiswal S. *Salmonella*, food safety and food handling practices. *Foods.* 2021; 10 (5):907. DOI: 10.3390/foods10050907.

4. O sostoyanii sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya naseleniya v Rossiiskoi Federatsii v 2020 godu = On sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2020 Moscow: The Federal Service for the Oversight of Consumer Protection and Welfare. 2021. 256 p. Available at: https://www.rospotrebнадзор.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=18266. (in Russ.)

5. O sostoyanii sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya naseleniya v Rossiiskoi Federatsii v 2019 godu = On sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2019. Moscow: The Federal Service for the Oversight of Consumer Protection and Welfare. 2020. 299 p. Available at: https://www.rospotrebнадзор.ru/upload/iblock/8e4/gosdoklad-za-2019_seb_29_05.pdf. (in Russ.)

6. Tsyganova S. V. Salmonellosis problem in poultry: an obstacle preventing biosecure production. *Ptitsevodstvo.* 2014; 4: 43–47. eLIBRARY ID: 21593427. (in Russ.)

7. Marchello C. S., Carr S. D., Crump J. A. A systematic review on antimicrobial resistance among *Salmonella* Typhi worldwide. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2020; 103 (6): 2518–2527. DOI: 10.4269/ajtmh.20-0258.

8. Threlfall E. J. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiol. Rev.* 2002; 26 (2): 141–148. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00606.x.

9. McEwen S. A., Collignon P. J. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiol. Spectr.* 2018; 6 (2). DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017.

10. Davydov D. S. The national strategy of the Russian Federation for preventing the spread of antimicrobial resistance: challenges and prospects of controlling one of the global biological threats of the 21st century. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie.* 2018; 18 (1): 50–56. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-1-50-56. (in Russ.)

11. WHO. High levels of antibiotic resistance found worldwide, new data shows. Available at: <https://www.who.int/news/item/29-01-2018-high-levels-of-antibiotic-resistance-found-worldwide-new-data-shows>.

12. McDermott P. F., Zhao S., Tate H. Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *Microbiol. Spectr.* 2018; 6 (4). DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0014-2017.

13. Antimicrobial resistance monitoring results complementing the EU Overview Summary Report on AMR in zoonotic and indicator bacteria from

humans, animals and food in 2017/2018 – Italy, 2020. DOI: 10.5281/zenodo.3636029.

14. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. *EFSA J.* 2020; 18 (3):6007. DOI: 10.2903/j.efsa.2020.6007.

15. EUCAST Clinical breakpoints – bacteria v.10.0. Available at: <https://iacmac.ru/ru/docs/eucast/eucast-clinical-breakpoints-bacteria-10.0-rus.pdf>. (in Russ.)

16. Magiorakos A. P., Srinivasan A., Carey R. B., Carmeli Y., Falagas M. E., Giske C. G., et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18 (3): 268–281. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.

17. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA J.* 2015; 13 (1):3991. DOI: 10.2903/j.efsa.2015.3991.

18. Ferrari R. G., Rosario D. K. A., Cunha-Neto A., Mano S. B., Figueiredo E. E. S., Conte-Junior C. A. Worldwide epidemiology of *Salmonella* serovars in animal-based foods: a meta-analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 2019; 85 (14):e00591-19. DOI: 10.1128/AEM.00591-19.

19. Grimont P. A. D., Weill F. X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9th ed. Paris; 2007. Режим доступа: https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf.

20. Jourdan-da Silva N., Fabre L., Robinson E., Fournet N., Nisavanh A., Bruyand M., et al. Ongoing nationwide outbreak of *Salmonella* Agona associated with internationally distributed infant milk products, France, December 2017. *Euro Surveill.* 2018; 23 (2): 17-00852. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.2.17-00852.

21. WHO. Stop using antibiotics in healthy animals to prevent the spread of antibiotic resistance. Режим доступа: <https://www.who.int/news/item/07-11-2017-stop-using-antibiotics-in-healthy-animals-to-prevent-the-spread-of-antibiotic-resistance>.

22. Terentjeva M., Avsejenko J., Streikiša M., Utināne A., Kovalenko K., Bērziņš A. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in meat and meat products in Latvia. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2017; 24 (2): 317–321. DOI: 10.5604/12321966.1235180.

23. CIPARS. 2016 CIPARS Annual Report: Executive summary. Режим доступа: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/surveillance/canadian-integrated-program-antimicrobial-resistance-surveillance-cipars/cipars-reports/2016-annual-report-summary.html>.

24. Castro-Vargas R. E., Herrera-Sánchez M. P., Rodríguez-Hernández R., Rondón-Barragán I. S. Antibiotic resistance in *Salmonella* spp. isolated from poultry: A global overview. *Vet. World.* 2020; 13 (10): 2070–2084. DOI: 10.14202/vetworld.2020.2070-2084.

25. Karkey A., Thwaites G. E., Baker S. The evolution of antimicrobial resistance in *Salmonella* Typhi. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2018; 34 (1): 25–30. DOI: 10.1097/MOG.0000000000000406.

26. Yang X., Huang J., Zhang Y., Liu S., Chen L., Xiao C., et al. Prevalence, abundance, serovars and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from retail raw poultry meat in China. *Sci. Total Environ.* 2020; 713:136385. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.136385.

27. Zeng Y. B., Xiong L. G., Tan M. F., Li H. Q., Yan H., Zhang L. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in pork, chicken, and duck from retail markets of China. *Foodborne Pathog. Dis.* 2019; 16 (5): 339–345. DOI: 10.1089/fpd.2018.2510.

Поступила в редакцию / Received 24.12.2021

Доработана после рецензирования / Revised 07.02.2022

Принята к публикации / Accepted 21.02.2022

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Шадрова Наталья Борисовна, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией микробиологических исследований ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Прунтова Ольга Владиславовна, доктор биологических наук, профессор, главный эксперт информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Корчагина Евгения Александровна, ведущий биолог лаборатории микробиологических исследований ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Natalya B. Shadrova, Candidate of Science (Biology), Head of Laboratory for Microbiological Testing, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Olga V. Pruntova, Doctor of Science (Biology), Professor, Chief Expert of the Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Evgenia A. Korchagina, Leading Biologist, Laboratory for Microbiological Testing, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.



Изучение формирования биопленок культурой *Pseudomonas aeruginosa* при различных режимах культивирования

Т. Е. Миронова¹, В. С. Черепушкина², В. Н. Афонюшкин³, Н. В. Давыдова⁴, В. Ю. Коптев⁵, А. С. Димова⁶

¹⁻⁵ ФГБУН Сибирский федеральный научный центр агробιοтехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН),

р. п. Краснообск, Новосибирская обл., Россия

^{1,3,6} ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный аграрный университет» (ФГБОУ ВО Новосибирский ГАУ), г. Новосибирск, Россия

³ ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН),

г. Новосибирск, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0003-0860-1778>, e-mail: mironovatanya9@gmail.com

² <https://orcid.org/0000-0001-5177-4733>, e-mail: vicky88@bk.ru

³ <https://orcid.org/0000-0002-3378-7335>, e-mail: lisocim@mail.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-4831-2957>, e-mail: ramira_@bk.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0003-0537-6659>, e-mail: kastrolog@mail.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0003-0307-4876>, e-mail: alesya-77@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Настоящее исследование посвящено изучению влияния условий культивирования на рост и формирование биопленок культурой *Pseudomonas aeruginosa*. В связи с высокой частотой встречаемости инфекционных заболеваний, вызванных *P. aeruginosa*, а также устойчивостью синегнойной палочки, в особенности из-за способности образовывать биопленки, данная тема не теряет актуальности. В работе проанализировали влияние на феномен биопленкообразования таких характеристик, как используемая для посева фаза роста культуры (логарифмическая, стационарная), объем среды для выращивания (0,2 и 1,0 мл) и концентрация питательных веществ (жидкие питательные среды, разведенные до концентраций 50; 25; 12,5 и 6%) в объеме культивирования. Проведенные исследования показали, что на образование биопленок оказывает влияние совокупность всех перечисленных параметров. Установлено, что определяющим фактором в формировании биопленок являлась фаза роста бактерий, в которой функционировала культура синегнойной палочки перед инокуляцией. При посеве *P. aeruginosa*, пребывающей в стационарной фазе роста, образование биопленок нелинейно зависело от концентрации питательных веществ и общего их количества в объеме культивирования. Линейная зависимость образования биопленок от концентрации питательных веществ в среде культивирования была более выражена при посеве *P. aeruginosa*, находящейся в фазе логарифмического роста. Установлено, что при меньших концентрациях компонентов питательных сред различия в образовании биопленок были более заметны и имели статистическую значимость. Разбавление жидкой питательной среды в 2 раза не влияло на интенсивность формирования пленки, в то время как 4–8-кратное снижение концентрации питательных веществ в объеме культивирования 0,2 мл ингибировало образование биопленок. В объеме среды для культивирования, равном 1,0 мл, формирование биопленок было равномерным, а в объеме 0,2 мл статистически значимо снижалось при разведении питательной среды в 4 и 8 раз. Объем культивирования также имеет важное значение: так, выращенные в 0,2 мл питательной среды культуры при разных концентрациях питательных веществ формировали меньшее количество биопленок, чем микроорганизмы, культивируемые в объеме 1,0 мл. При этом при посеве *P. aeruginosa*, находящихся как в логарифмической, так и в стационарной фазах роста, более выраженным было образование биопленок в лунках с большим объемом культивирования.

Ключевые слова: биопленки, бактерии, *P. aeruginosa*, синегнойная палочка, фаза стационарного роста, фаза логарифмического роста

Благодарности: Результаты получены при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (номер соглашения 075-15-2021-1085).

Для цитирования: Миронова Т. Е., Черепушкина В. С., Афонюшкин В. Н., Давыдова Н. В., Коптев В. Ю., Димова А. С. Изучение формирования биопленок культурой *Pseudomonas aeruginosa* при различных режимах культивирования. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (1): 35–41. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-35-41.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Афонюшкин Василий Николаевич, кандидат биологических наук, заведующий сектором молекулярной биологии ИЭВСИДВ СФНЦА РАН, 630501, Россия, Новосибирская область, Новосибирский район, р. п. Краснообск, а/я 8, e-mail: lisocim@mail.ru.

Studying formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown under different cultivation conditions

T. E. Mironova¹, V. S. Cherepushkina², V. N. Afonyushkin³, N. V. Davydova⁴, V. Yu. Koptev⁵, A. S. Dimova⁶

¹⁻⁵ Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences (SFSCA RAS), Krasnoobsk, Novosibirsk Oblast, Russia

^{1,3,6} FSBEI HE “Novosibirsk State Agrarian University” (FSBEI HE Novosibirsk SAU), Novosibirsk, Russia

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (ICBFM SB RAS), Novosibirsk, Russia

¹ <https://orcid.org/0000-0003-0860-1778>, e-mail: mirnovatanyaya9@gmail.com

² <https://orcid.org/0000-0001-5177-4733>, e-mail: vicky88@bk.ru

³ <https://orcid.org/0000-0002-3378-7335>, e-mail: lisocim@mail.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-4831-2957>, e-mail: ramira_@bk.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0003-0537-6659>, e-mail: kastrolog@mail.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0003-0307-4876>, e-mail: alesya-77@mail.ru

SUMMARY

The purpose of the present study is to assess how cultivation conditions influence growth and formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. The topic is of great importance due to high incidence of *P. aeruginosa*-caused infections and *P. aeruginosa* resistance associated with its ability to form biofilms. The paper analyzes factors that influence biofilm formation, i.e.: growth phase used for inoculation (log, stationary), volume of the growth medium (0.2 and 1.0 ml) and concentration of nutrients (liquid nutrient media diluted to concentrations of 50; 25; 12.5 and 6%) in the cultivation volume. As the research demonstrates, all these factors influence biofilm formation; and a *P. aeruginosa* growth phase before inoculation is a determining factor in the biofilm formation. When *P. aeruginosa* is inoculated at a stationary phase, biofilm formation shows non-linear dependence on concentration of nutrients and on their total amount in the cultivation volume. The linear dependence of biofilm formation on concentration of nutrients in the culture medium is more pronounced, when *P. aeruginosa* is inoculated at a log phase. The study shows that lower concentrations of nutrient media components lead to more noticeable differences in biofilm formation, and such differences are statistically significant. Two-fold dilution of the liquid nutrient medium does not affect the intensity of biofilm formation; however, a 4 to 8-fold decrease in concentration of nutrients in 0.2 ml of cultivation volume inhibited the biofilms formation. In 1.0 ml of the culture medium, the biofilm forms evenly, and in 0.2 ml of 4–8-fold dilution of nutrient medium it grows slower. The slow growth rate is statistically significant. The cultivation volume is also of great importance. For example, cultures grown in 0.2 ml of nutrient medium at different concentrations of nutrients formed fewer biofilms than microorganisms cultivated in 1.0 ml. At the same time, when inoculating *P. aeruginosa* both at log and stationary growth phases, biofilm formation is more pronounced in wells containing more cultivation volume.

Keywords: biofilms, bacteria, *P. aeruginosa*, stationary growth phase, log growth phase

Acknowledgements: The results were obtained with the financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement number 075-15-2021-1085).

For citation: Mironova T. E., Cherepushkina V. S., Afonyushkin V. N., Davydova N. V., Koptev V. Yu., Dimova A. S. Studying formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown under different cultivation conditions. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (1): 35–41. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-35-41.

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

For correspondence: Vasily N. Afonyushkin, Candidate of Science (Biology), Head of the Molecular Biology Sector, SFSCA RAS, 630501, Russia, Novosibirsk Oblast, Novosibirsky Raion, Krasnoobsk, а/я 8, e-mail: lisocim@mail.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших факторов персистенции и защиты микроорганизмов от иммунного ответа макроорганизма можно назвать способность образовывать биопленки [1–3]. Биопленка представляет собой сообщество микроорганизмов, прикрепленных либо к поверхности субстрата, либо друг к другу, окруженных экзополимерным матриксом – основным структурным компонентом биопленки. Фенотип бактерий, находящихся в составе биопленки, изменен по сравнению с одиночными планктонными клетками, трансформированы параметры роста и экспрессии специфических генов [4–7].

Пленка бактерий является живым, постоянно обновляющимся сообществом одного или нескольких видов микроорганизмов, при этом матрикс, который их окружает, выполняет функцию защиты от неблагоприятных воздействий окружающей среды, а также служит одним из факторов межклеточного общения. Свойства матрикса определяют взаимоотношения внутриклеточного сообщества и внешней среды [3, 6, 8, 9].

Более 95% всех микроорганизмов находятся в природных экосистемах в виде специфически органи-

зованных биопленок [5]. Одним из микроорганизмов, способных образовывать биопленки, является *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка, СГП, *P. aeruginosa*) – убиквитарный инфекционный агент, являющийся возбудителем ряда оппортунистических заболеваний. *P. aeruginosa* выявляют в крови при сепсисе в 20%, в мокроте при муковисцидозе в 70%, при госпитальных пневмониях до 70%, при интраабдоминальных инфекциях в 28% случаев, его доля в общей этиологической структуре внутрибольничных инфекций находится в пределах 20–30% [10].

Для *P. aeruginosa* характерна высокая устойчивость к антисептическим и дезинфицирующим веществам. Микроорганизм обладает широким спектром факторов патогенности, высоким эпидемическим потенциалом и уникальными адаптационными свойствами, способен снижать эффективность иммунного ответа организма [2, 11–14].

Бактерии в биопленках синтезируют альгинат (мукоидный экзополисахарид) и образуют экзополимерный альгинатный матрикс. Штаммы, способные продуцировать альгинат, обычно выявляют при хронических

инфекциях, к примеру на фоне муковисцидоза. Бактериальная пленка защищает микроорганизм, в том числе от факторов естественной резистентности организма (лимфоциты, фагоциты, естественное движение реснитчатого эпителия дыхательного тракта, антитела и др.). Также доказана роль систем quorum sensing в формировании биопленок у *P. aeruginosa* [1, 2, 14, 15].

Высокая частота встречаемости и огромная роль синегнойной палочки в возникновении большого количества инфекционных заболеваний, трудно поддающихся лечению, в частности из-за способности формировать биопленки, определяет актуальность данной работы.

В настоящее время опубликованы научные исследования, показывающие, что корреляция между ростом планктонной культуры и образованием биопленок существует, но не является абсолютной [2].

Новизна работы состоит в изучении феномена биопленкообразования при различных режимах культивирования *P. aeruginosa*, в частности, в зависимости от концентрации питательных веществ в объеме культивирования, а также используемой для посева фазы роста культуры.

Определяющими факторами при образовании биопленок в условиях микробиологических исследований являются: культуральные, ферментативные свойства и т. д. изучаемой микробиоты; условия культивирования (температура, состав среды, концентрация питательных веществ и т. д.); материал, на поверхности которого будет формироваться биопленка, и многое другое.

Целью данного исследования явилось изучение особенностей формирования биопленок культурой бактерий *P. aeruginosa* при различных режимах культивирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактерии. Изучение влияния условий культивирования на рост биопленок проводили на примере штамма бактерии *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, который был получен из коллекции музея сектора молекулярной биологии ИЭВСИДВ СФНЦА РАН.

Культивирование *P. aeruginosa* и бактериальных биопленок. Культуру *P. aeruginosa* ATCC 9027 выращивали в жидкой питательной среде LB-Luria (0,5 г/л NaCl; HiMedia) после предварительной серии пассажей при комнатной температуре на качалке в течение 6 и 24 ч. Пересев бульонной культуры производился каждые 24 ч.

Изучение влияния фазы роста бульонной культуры *P. aeruginosa*, объема питательной среды в лунке и концентрации питательных компонентов на формирование биопленок. Для оценки влияния фазы роста используемых для посева бактерий *P. aeruginosa* на образование биопленок проводили инокуляцию в питательную среду 6- и 24-часовой культуры в период логарифмической и стационарной фаз роста (прошедших серию пассажей в этой фазе культивирования). Затем приготовили разведение бульонной суспензии синегнойной палочки до значения 0,4 по стандарту МакФарланда в пропорции 100 мкл культуры на 10 мл питательной среды. Инокулюм был приготовлен путем внесения колоний штамма *P. aeruginosa* ATCC 9027 в стерильный физиологический раствор с последующим доведением плотности микробной суспензии до указанной концентрации.

Для оценки взаимного влияния объема и концентрации питательных веществ на интенсивность образования биопленок синегнойной палочкой используемые для культивирования жидкие питательные среды LB-Luria (0,5 г/л NaCl) и Шедлера (HiMedia) разводили физиологическим раствором до концентрации 50; 25; 12,5; 6% и вносили в лунки плоскодонных полистироловых планшетов в объемах 0,2 и 1,0 мл в четырех повторностях. Далее в лунки планшета погружали микропланшет с лунками, имеющими V-образное дно, и инокулировали бульонную культуру *P. aeruginosa*. Посевы инкубировали при температуре $(25,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 18 ч.

В качестве негативного контроля использовали питательные среды LB-Luria и Шедлера (HiMedia) без добавления микробного инокулята; контроль роста *P. aeruginosa* проводили в шести повторностях.

Метод окрашивания биопленок. Для оценки роста биопленок проводили их окрашивание генцианом фиолетовым (crystal violet) – красителем, связывающимся с клетками и матриксом биопленок, – по существующей методике [16] в модифицированной форме: после завершения культивирования не прикрепившиеся к поверхности лунок бактерии осторожно удаляли путем трехкратного промывания деионизированной водой. Биопленки, сформировавшиеся в лунках микропланшета, высушивали при комнатной температуре в течение 2 ч, фиксировали спиртом 40 мин и окрашивали 0,05%-м раствором генциана фиолетового 40 мин. Несвязавшийся краситель трехкратно отмывали 0,01 М фосфатно-солевым буфером с pH 7,2 (по 3 мин на одну промывку). Затем микропланшет с биопленками погружали в лунки полистиролового плоскодонного микропланшета с 200 мкл 96%-го этилового спирта для элюирования несвязавшегося красителя. Количественную оценку сформировавшихся биопленок проводили, определяя оптическую плотность с помощью планшетного спектрофотометра Tecan Sunrise (Tecan, Австрия) при длине волны 450 нм (OD_{450}), по интенсивности окрашивания спирта экстрагированным красителем.

Статистическая обработка данных. Данные обрабатывали методами вариационной статистики с помощью пакета программ Statistica 13.3. Статистическую значимость различий оценивали с использованием t-теста Стьюдента (критерий достоверности). Достоверными считали различия при уровне $p < 0,05$. Исследование взаимосвязи изучаемых параметров оценивали при помощи коэффициента корреляции Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании исходили из гипотезы, рассматривающей синтез альгината *P. aeruginosa* в первую очередь в качестве фактора запасаения питательных веществ, необходимых для обеспечения энергетического обмена, в условиях дефицита питания, позволяющего обеспечивать рост культуры. Учитывая данную гипотезу, следует ожидать нелинейности характера образования биопленок при уменьшении количества и концентрации питательных веществ в культуральной среде.

Как свидетельствуют полученные результаты исследований, интенсивность формирования биопленок синегнойной палочкой различается в зависимости от концентрации питательных веществ, объема питательной среды в лунке и фазы роста культуры, используемой для посева. При уменьшении концентрации

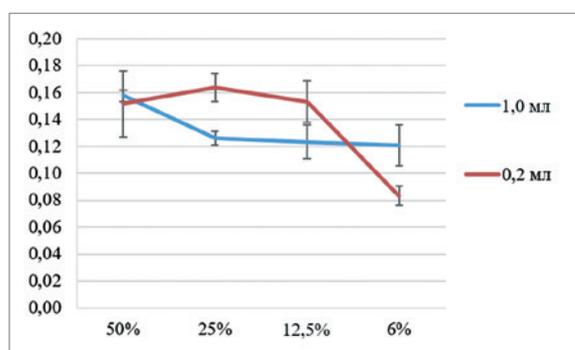
Таблица 1

Рост биопленок *P. aeruginosa* ATCC 9027 при разных режимах культивирования, OD_{450} , $M \pm SD$ ($n = 4$)

Table 1

Growth of *P. aeruginosa* ATCC 9027 biofilms under different cultivation conditions, OD_{450} , $M \pm SD$ ($n = 4$)

Фаза роста культуры <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027/ питательная среда	Объем питательной среды в лунках, мл							
	1,0				0,2			
	Концентрация питательных сред, %							
	50	25	12,5	6	50	25	12,5	6
Стационарная фаза/LB	0,16 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,01***	0,15 ± 0,02***	0,08 ± 0,01***
Логарифмическая фаза/ Шедлера	0,25 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,31 ± 0,05*	0,26 ± 0,07**	0,25 ± 0,03**	0,14 ± 0,02
Логарифмическая фаза/LB	0,18 ± 0,04	0,17 ± 0,04	0,16 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,17 ± 0,03	0,16 ± 0,02	0,14 ± 0,02**	0,11 ± 0,01

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.Рис. 1. Рост биопленок *P. aeruginosa* ATCC 9027 (посев культуры, выращенной до стационарной фазы) в лунках с объемом среды LB 0,2 и 1,0 мл и разной концентрацией питательных веществ, OD_{450} ($M \pm SD$)Fig. 1. Growth of *P. aeruginosa* ATCC 9027 biofilms (inoculation of culture grown up to a stationary phase) in wells containing 0.2 and 1.0 ml of LB medium and different concentrations of nutrients, OD_{450} ($M \pm SD$)

компонентов в питательных средах различия в образовании биопленок были более заметны и имели статистическую значимость (табл. 1).

При использовании для посева культуры синегнойной палочки, находящейся в стационарной фазе роста в течение 48 ч, процесс образования биопленки зависел только от концентрации питательных веществ в объеме культивирования (рис. 1). Так, при разбавлении среды LB в 2 раза объем культивирования не влиял на интенсивность роста биопленки. При 4–8-кратном разбавлении питательной среды *P. aeruginosa* формировала биопленку большей плотности при выращивании в лунках с 1,0 мл бульона, чем при выращивании в 0,2 мл среды ($p = 0,000232$ и $0,000129$ соответственно). В данном диапазоне концентраций питательной среды интенсивность образования биопленки была одинаковой и статистически значимо снижалась в объеме культивирования 0,2 мл в сравнении с культурой, выращиваемой в 1,0 мл питательной среды ($p = 0,000825$).

Представленные на рисунке 2 данные показывают, что при использовании в качестве посевного материала

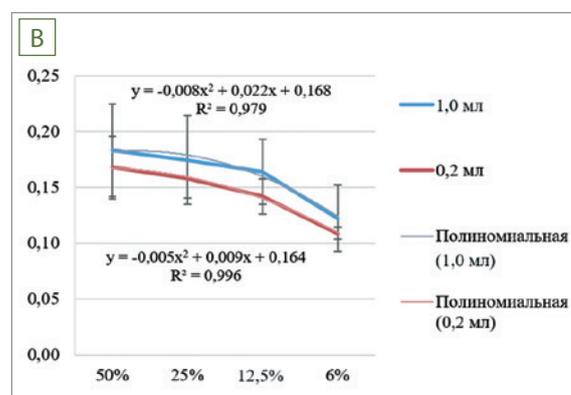
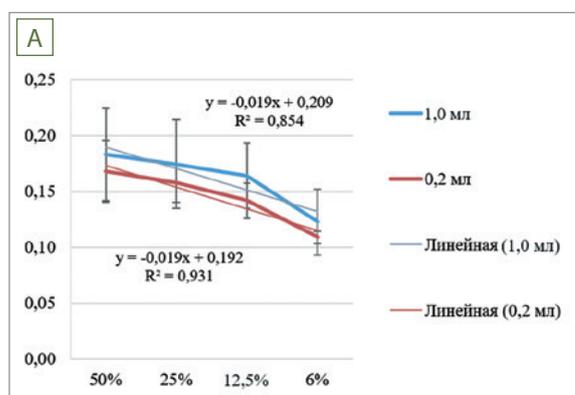
Рис. 2. Рост биопленок *P. aeruginosa* ATCC 9027 (посев культуры, выращенной до логарифмической фазы) в лунках с объемом среды LB 0,2 и 1,0 мл и разной концентрацией питательных веществ, OD_{450} ($M \pm SD$): А – линейный тренд; В – полиномиальный тренд

Fig. 2. Growth of *P. aeruginosa* ATCC 9027 biofilms (inoculation of culture grown up to a log phase) in wells containing 0.2 and 1.0 ml of LBa medium and different concentrations of nutrients, OD_{450} ($M \pm SD$): A – linear trend; B – polynomial trend

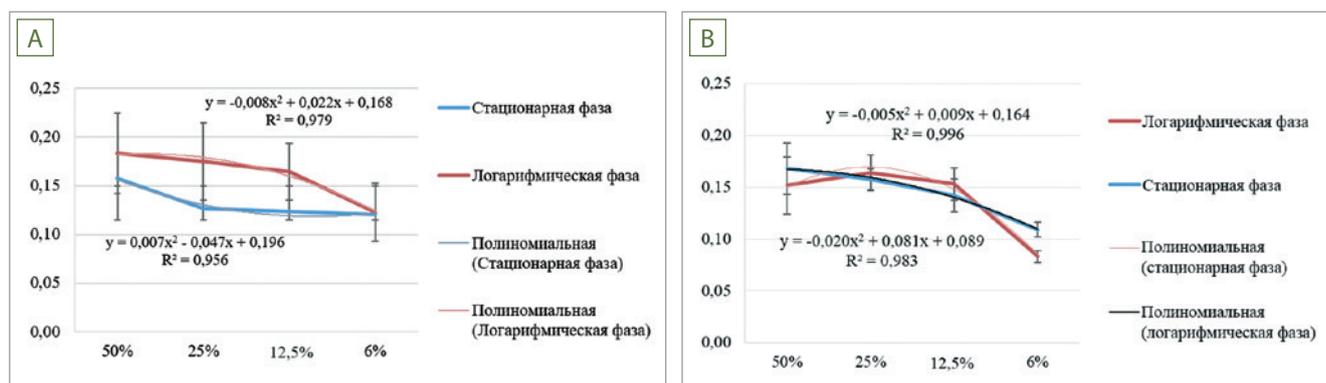


Рис. 3. Рост биопленок *P. aeruginosa* ATCC 9027 (посев культур, выращенных до логарифмической и стационарной фаз) в лунках с разным объемом среды LB и разной концентрацией питательных веществ, OD_{450} ($M \pm SD$): А – объем 1,0 мл; В – объем 0,2 мл

Fig. 3. Growth of *P. aeruginosa* ATCC 9027 biofilms (inoculation of cultures grown up to log and stationary phases) in wells containing different volumes of LB medium and different concentrations of nutrients, OD_{450} ($M \pm SD$): А – 1.0 ml; В – 0.2 ml

ла *P. aeruginosa*, находящейся в фазе логарифмического роста (прошедшей серию пассажей в этой фазе культивирования), на интенсивность биопленкообразования также влияла концентрация питательных веществ в среде Шедлера. Следует учесть, что объем культивирования 0,2 мл подразумевает 5-кратную разницу в общем содержании питательных веществ по сравнению с 1,0 мл. Соответственно, все кривые зависимостей не пересекались, образование биопленок в объеме культивирования 0,2 мл было закономерно меньше при всех концентрациях питательных веществ в сравнении с культурами, выращиваемыми в объеме 1,0 мл.

При разбавлении питательной среды в 8 раз наблюдается резкое снижение эффективности синтеза матрикса биопленок как при культивировании в объеме 1,0 мл, так и при выращивании в объеме 0,2 мл. Данный факт подтверждается тем, что зависимость образования биопленки от содержания питательных веществ точнее описывается двухстепенной полиномиальной функцией ($R^2 = 0,996-0,979$), чем линейной функцией ($R^2 = 0,854-0,931$).

Влияние используемой для посева фазы роста культуры *P. aeruginosa* на образование биопленок было наиболее выражено при культивировании в объеме 1,0 мл с использованием питательной среды LB, разбавленной в 4 и 8 раз ($p = 0,0209$ и $0,0053$ соответственно). Подобная зависимость не наблюдалась при культивировании данных бактерий в объеме 0,2 мл (рис. 3).

Закономерно, что метаболически более активная культура в логарифмической фазе роста эффективнее использовала компоненты питательной среды. При этом количество питательных веществ, извлеченных из объема культивирования 1,0 мл, было больше, чем из объема 0,2 мл.

Нелинейный характер образования биопленок во взаимосвязи с концентрацией и общим содержанием питательных веществ в среде культивирования позволяет предполагать связь биопленок с функцией запаса и концентрации питательных веществ. Различия в интенсивности синтеза биопленок, связанные с фазой роста культуры при посеве, позволяют выдвинуть предположение о влиянии не только генетической изменчивости, но и допускают возможность

сохранения фенотипа за счет эпигенетических механизмов реакции quorum sensing у *P. aeruginosa*.

На основании данных, полученных при культивировании статических биопленок в жидких питательных средах, было сделано заключение о влиянии на биопленкообразование концентрации питательных веществ, объема среды и фазы роста культуры, используемой для посева.

Установлено, что определяющим фактором при формировании биопленок является фаза роста бактерий, в которой функционировала культура на момент инокуляции. При посеве *P. aeruginosa*, находящейся в стационарной фазе роста в течение 48 ч, образование биопленок нелинейно зависело от концентрации питательных веществ и от их общего количества в объеме культивирования. Разбавление питательной среды LB в 2 раза не оказывало влияния на рост пленки, в то время как 4–8-кратное снижение концентрации питательных веществ в объеме культивирования 1,0 мл стимулировало образование биопленок.

В объеме культивирования 1,0 мл интенсивность формирования биопленок была равномерной и не зависела от степени разбавления среды LB, а в объеме 0,2 мл статистически значимо снижалась при разведении в 4 и 8 раз.

Линейная зависимость образования биопленок от концентрации питательных веществ в среде культивирования Шедлера была более выражена при посеве *P. aeruginosa*, находящейся в фазе логарифмического роста. Графики зависимости описывались линейной функцией с коэффициентом корреляции $R^2 = 0,854-0,931$.

Культуры, выросшие в меньшем объеме культивирования (0,2 мл) при разных концентрациях питательных веществ, формировали биопленки меньшей плотности по сравнению с микроорганизмами, культивируемыми в объеме 1,0 мл.

При изучении влияния логарифмической и стационарной фаз роста культуры *P. aeruginosa* на образование биопленок было установлено, что формирование пленки более интенсивно протекало в объеме культивирования 1,0 мл. При этом метаболически более активная культура, инокулированная в логарифмической

фазе роста, использовала питательные вещества среды культивирования эффективнее.

Результаты исследования влияния концентрации и общего содержания питательных веществ в объеме культивирования на образование биопленок позволяют предположить наличие связи между формированием пленок и функцией запасаения и концентрирования питательных компонентов среды. При этом важно отметить наличие нелинейного характера формирования пленок, подтверждающего гипотезу о том, что в условиях дефицита питания для обеспечения своего роста способность *P. aeruginosa* синтезировать альгинат позволяет задерживать и поддерживать концентрацию питательных веществ, необходимых для роста популяции. Также вследствие истощения питательных веществ при накоплении продуктов метаболизма происходит ингибирование жизнедеятельности всех микроорганизмов, входящих в состав биопленки, при этом при низких концентрациях питательных веществ данный процесс закономерно снижается.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования было установлено, что на формирование биопленок бактерией *P. aeruginosa* оказывает влияние как фаза роста культуры, используемая для посева, так и объем лунки для выращивания, а также концентрация питательных веществ, находящихся в объеме культивирования.

При изучении влияния фазы роста культуры, в которой функционировали микроорганизмы перед посевом на жидкие питательные среды, было установлено, что данный фактор имеет первостепенное значение. Как показали результаты определения оптических плотностей исследуемых образцов, при посеве *P. aeruginosa*, находящейся в фазе логарифмического роста, линейная зависимость образования пленок от концентрации питательных веществ в объеме культивирования была более выражена в сравнении с культурой, функционирующей в фазе стационарного роста. В случае использования в качестве посевного материала *P. aeruginosa*, выращенной до стационарной фазы, наблюдали равномерный рост биопленок при разных концентрациях питательных компонентов в среде и объемах культивирования. Биопленкообразование бактерией, пребывающей в фазе логарифмического роста, в лунках объемом 0,2 мл при понижении концентрации питательных веществ (50, 25, 12,5 и 6%) в жидкой питательной среде Шедлера характеризовалось следующими показателями роста: $0,31 \pm 0,05$; $0,26 \pm 0,07$; $0,25 \pm 0,03$; $0,14 \pm 0,02$; в объеме культивирования 1,0 мл показатели роста пленок составили: $0,25 \pm 0,02$; $0,16 \pm 0,02$; $0,16 \pm 0,01$; $0,13 \pm 0,01$. При культивировании синегнойной палочки в жидкой питательной среде LB также отмечали выраженную линейную зависимость образования пленок от концентрации питательных веществ. В лунках объемом 0,2 мл показатели роста биопленок были следующими: при концентрации питательных сред 50% – $0,17 \pm 0,03$; при 25% – $0,16 \pm 0,02$; при 12,5% – $0,14 \pm 0,02$; при 6% – $0,11 \pm 0,01$. В лунках объемом 1,0 мл данные показатели имели следующие значения: при 50%-й концентрации среды – $0,18 \pm 0,04$; при 25%-й – $0,17 \pm 0,04$; при 12,5%-й – $0,16 \pm 0,03$; при 6%-й – $0,12 \pm 0,03$. Также установлено, что в объеме культивирования 1,0 мл интенсивность образования биопленок была равномерной, а в объеме 0,2 мл статистически значимо

снижалась при разведении питательной среды в 4 и 8 раз. При этом 4–8-кратное снижение концентрации питательных веществ в объеме культивирования 1,0 мл стимулировало образование биопленок.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Егорова О. Н., Брусина Е. В., Григорьев Е. В. Эпидемиология и профилактика синегнойной инфекции. Федеральные клинические рекомендации. М.: 2014. 82 с. Режим доступа: https://mz19.ru/upload/iblock/7b6/2014_4_p.aerug_new.pdf.
2. Марданова А. М., Кабанов Д. А., Рудакова Н. Л., Шарипова М. Р. Биопленки: основные принципы организации и методы исследования: учебно-методическое пособие. Казань: К(П)ФУ; 2016. 42 с. Режим доступа: https://kpfu.ru/portal/docs/F1250326711/posobie._Bioplenki._Mardanova.AM.Kabanov.D.A.Sharipova.M.R.pdf.
3. Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284 (5418): 1318–1322. DOI: 10.1126/science.284.5418.1318.
4. Литвиненко З. Н. Влияние органических веществ на формирование биопленок в водных системах: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Хабаровск; 2015; 9–10. Режим доступа: <https://viewer.rusneb.ru/rls01005559845?page=1&rotate=0&theme=white>.
5. Donlan R. M., Costerton J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15 (2): 167–193. DOI: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.
6. Hentzer M., Teitzel G. M., Balzer G. J., Heydorn A., Molin S., Givskov M., et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J. Bacteriol.* 2001; 183 (18): 5395–5401. DOI: 10.1128/JB.183.18.5395-5401.2001.
7. Tetz V. V. The effect of antimicrobial agents and mutagen on bacterial cells in colonies. *Med. Microbiol. Lett.* 1996; 5 (8): 426–436.
8. Маянский А. Н., Чеботарь И. В. Стафилококковые биопленки: структура, регуляция, отторжение. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2011; 1: 101–108. eLIBRARY ID: 19059408.
9. Романова Ю. М., Гинцбург А. Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2011; 3: 99–109. eLIBRARY ID: 21064122.
10. Чеботарь И. В., Бочарова Ю. А., Маянский Н. А. Механизмы резистентности *Pseudomonas aeruginosa* к антибиотикам и их регуляция. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017; 19 (4): 308–319. eLIBRARY ID: 32501810.
11. Cross A., Allen J. R., Burke J., Duce G., Harris A., John J., et al. Nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*: review of recent trends. *Rev. Infect. Dis.* 1983; 5 (Suppl 5): 837–845. DOI: 10.1093/clinids/5.supplement_5.s837.
12. Gibson R. L., Burns J. L., Ramsey B. W. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 168 (8): 918–951. DOI: 10.1164/rccm.200304-505SO.
13. Peleg A. Y., Hooper D. C. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N. Engl. J. Med.* 2010; 362 (19): 1804–1813. DOI: 10.1056/NEJMr0904124.
14. Singh P. K., Schaefer A. L., Parsek M. R., Moninger T. O., Welsh M. J., Greenberg E. P. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature*. 2000; 407 (6805): 762–764. DOI: 10.1038/35037627.
15. Oglesby L. L., Jain S., Ohman D. E. Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization. *Microbiology (Reading)*. 2008; 154: 1605–1615. DOI: 10.1099/mic.0.2007/015305-0.
16. O'Toole G. A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 1998; 28 (3): 449–461. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x.

REFERENCES

1. Egorova O. N., Brusina E. V., Grigor'ev E. V. Epidemiologiya i profilaktika sinegnoinoi infektsii. Federal'nye klinicheskie rekomendatsii = Epidemiology and prevention of pseudomonas infection. Federal clinical guidelines. Moscow: 2014. 82 p. Available at: https://mz19.ru/upload/iblock/7b6/2014_4_p.aerug_new.pdf. (in Russ.)
2. Mardanova A. M., Kabanov D. A., Rudakova N. L., Sharipova M. R. Bioplenki: osnovnye printsipy organizatsii i metody issledovaniya: uchebno-metodicheskoe posobie = Biofilms: basic principles of research and test methods: study guide. Kazan: K(P)FU; 2016. 42 p. Available at: https://kpfu.ru/portal/docs/F1250326711/posobie._Bioplenki._Mardanova.AM.Kabanov.D.A.Sharipova.M.R.pdf. (in Russ.)
3. Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284 (5418): 1318–1322. DOI: 10.1126/science.284.5418.1318.

4. Litvinenko Z. N. Vliyaniye organicheskikh veshchestv na formirovaniye bioplenok v vodnykh sistemakh = Impact of organic substances on biofilms formation in aquatic systems: author's abstract of Candidate of Science (Biology) thesis. Khabarovsk; 2015; 9–10. Available at: <https://viewer.rusneb.ru/ru/rsl01005559845?page=1&rotate=0&theme=white>. (in Russ.)
5. Donlan R. M., Costerton J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15 (2): 167–193. DOI: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.
6. Hentzer M., Teitzel G. M., Balzer G. J., Heydorn A., Molin S., Givskov M., et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J. Bacteriol.* 2001; 183 (18): 5395–5401. DOI: 10.1128/JB.183.18.5395-5401.2001.
7. Tetz V. V. The effect of antimicrobial agents and mutagen on bacterial cells in colonies. *Med. Microbiol. Lett.* 1996; 5 (8): 426–436.
8. Mayansky A. N., Chebotar I. V. Staphylococcal biofilms: structure, regulation, rejection. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2011; 1: 101–108. eLIBRARY ID: 19059408. (in Russ.)
9. Romanova Yu. M., Gintsburg A. L. Bacterial biofilms as a natural form of existence of bacteria in the environment and host organism. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2011; 3: 99–109. eLIBRARY ID: 21064122. (in Russ.)
10. Chebotar I. V., Bocharova Yu. A., Mayansky N. A. Mechanisms and regulation of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2017; 19 (4): 308–319. eLIBRARY ID: 32501810. (in Russ.)
11. Cross A., Allen J. R., Burke J., Duce G., Harris A., John J., et al. Nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*: review of recent trends. *Rev. Infect. Dis.* 1983; 5 (Suppl 5): 837–845. DOI: 10.1093/clinids/5.supplement_5.s837.
12. Gibson R. L., Burns J. L., Ramsey B. W. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 168 (8): 918–951. DOI: 10.1164/rccm.200304-505SO.
13. Peleg A. Y., Hooper D. C. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N. Engl. J. Med.* 2010; 362 (19): 1804–1813. DOI: 10.1056/NEJMra0904124.
14. Singh P. K., Schaefer A. L., Parsek M. R., Moninger T. O., Welsh M. J., Greenberg E. P. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature.* 2000; 407 (6805): 762–764. DOI: 10.1038/35037627.
15. Oglesby L. L., Jain S., Ohman D. E. Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization. *Microbiology (Reading).* 2008; 154: 1605–1615. DOI: 10.1099/mic.0.2007/015305-0.
16. O'Toole G. A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 1998; 28 (3): 449–461. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x.

Поступила в редакцию / Received 17.08.2021

Доработана после рецензирования / Revised 28.09.2021

Принята к публикации / Accepted 25.12.2021

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Миронова Татьяна Евгеньевна, аспирант ФГБОУ ВО Новосибирский ГАУ, младший научный сотрудник сектора молекулярной биологии ИЭВСиДВ СФНЦА РАН, р. п. Краснообск, Новосибирская обл., Россия.

Черепушкина Виктория Сергеевна, младший научный сотрудник сектора молекулярной биологии ИЭВСиДВ СФНЦА РАН, р. п. Краснообск, Новосибирская обл., Россия.

Афонюшкин Василий Николаевич, кандидат биологических наук, заведующий сектором молекулярной биологии ИЭВСиДВ СФНЦА РАН, р. п. Краснообск, Новосибирская обл., Россия.

Давыдова Наталия Владимировна, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник сектора молекулярной биологии ИЭВСиДВ СФНЦА РАН, р. п. Краснообск, Новосибирская обл., Россия.

Коптев Вячеслав Юрьевич, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник лаборатории болезней молодняка ИЭВСиДВ СФНЦА РАН, р. п. Краснообск, Новосибирская обл., Россия.

Димова Аlesia Сергеевна, доктор ветеринарных наук, доцент кафедры эпизоотологии и микробиологии ФГБОУ ВО Новосибирский ГАУ, г. Новосибирск, Россия.

Tatyana E. Mironova, Post-Graduate Student, FSBEI HE Novosibirsk SAU, Junior Researcher, Molecular Biology Sector, SFSCA RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk Oblast, Russia.

Victoriya S. Cherepushkina, Junior Researcher, Molecular Biology Sector, SFSCA RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk Oblast, Russia.

Vasily N. Afonyushkin, Candidate of Science (Biology), Head of the Molecular Biology Sector, SFSCA RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk Oblast, Russia.

Nataliya V. Davydova, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Molecular Biology Sector, SFSCA RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk Oblast, Russia.

Vyacheslav Yu. Koptev, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Diseases of Young Animals, SFSCA RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk Oblast, Russia.

Alesya S. Dimova, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Department of Epizootology and Microbiology, FSBEI HE Novosibirsk SAU, Novosibirsk, Russia.



Бактериология и патологическая анатомия пневмоний у обезьян

В. А. Калашникова¹, Н. С. Руденко²

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» (ФГБНУ «НИИ МП»), г. Сочи, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0002-1574-8674>, e-mail: vikky.aw@gmail.com

² e-mail: lab-rns@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Приведены данные по этиологической структуре потенциальных возбудителей пневмоний у обезьян согласно данным патолого-анатомической картины с последующими бактериологическими исследованиями тканей легких, взятых из морфологически измененных участков органа. В период с 2019 по 1-е полугодие 2021 г. от пневмоний погибло 377 животных. Наибольшая гибель от пневмоний отмечена у новорожденных (0–8 сут) и детенышей до 1 месяца (161 особь). В 94,4% случаев у погибших обезьян была выявлена полисегментарная бронхопневмония, доля крупозных пневмоний составила 4,5%. У детенышей пневмония чаще являлась единственным заболеванием. Микробный пейзаж при пневмониях обезьян отличался широким разнообразием. Из легочной ткани выделено 899 бактерий разных таксономических групп, из грамположительной микрофлоры преобладали стафилококки (23,8%), из грамотрицательной – *Escherichia coli* (32,1%). Доля *Streptococcus pneumoniae* составила 0,3%. Удельный вес пневмоний неустановленной этиологии, по данным бактериологического исследования, был равен 0,7%. При исследовании образцов легочной ткани также выявлены бактериальные ассоциации, как правило, двух- и трехкомпонентные. Среди патогенов-ассоциантов чаще встречались следующие комбинации: *Escherichia coli* + *Proteus* spp. (24,7%), *Staphylococcus aureus* + *Escherichia coli* (19,6%), *Staphylococcus* spp. + *Enterococcus* spp. + *Escherichia coli* (35,5%), *Staphylococcus* spp. + *Escherichia coli* + *Proteus* spp. (21,2%). Практически все выявленные энтеробактерии имеют высокий коэффициент ассоциативности, встречаясь в основном в виде ассоциаций. Анализ результатов исследования показал, что практически любой микроорганизм изолированно или в комбинации может привести к развитию пневмонии при ослаблении иммунитета животного, поэтому нельзя недооценивать влияние микрофлоры. Также возрастает роль микробов-ассоциантов в развитии пневмонии у обезьян, содержащихся в условиях неволи.

Ключевые слова: обезьяны, пневмония, полисегментарная бронхопневмония, крупозная пневмония, бактериальные возбудители, микробные ассоциации

Для цитирования: Калашникова В. А., Руденко Н. С. Бактериология и патологическая анатомия пневмоний у обезьян. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (1): 42–48. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-42-48.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Калашникова Виктория Алексеевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории инфекционной патологии ФГБНУ «НИИ МП», 354376, Россия, Краснодарский край, г. Сочи-А, с. Веселое, ул. Мира, 177, e-mail: vikky.aw@gmail.com.

Bacteriology and pathological anatomy of pneumonias in monkeys

V. A. Kalashnikova¹, N. S. Rudenko²

FSBSI "Research Institute of Medical Primatology" (FSBSI "RIMP"), Sochi, Russia

¹ <https://orcid.org/0000-0002-1574-8674>, e-mail: vikky.aw@gmail.com

² e-mail: lab-rns@mail.ru

SUMMARY

Data on the etiological structure of potential pneumonia agents in monkeys based on postmortem findings and subsequent bacteriological tests of lung tissues collected from the organ areas showing morphological changes are presented. In the period between 2019 and the first half of 2021, 377 animals died of pneumonia. The highest pneumonia-associated mortality was observed in newborn (0–8-day-old) and baby monkeys under the age of 1 month (161 animals). Polysegmental bronchopneumonia was detected in the dead monkeys in 94.4% of cases, croupous pneumonias accounted for 4.5%. Pneumonia was typically the only disease detected in baby monkeys. The microbial landscape in pneumonia affected monkeys was characterized by a broad diversity: 899 bacteria of different taxonomic groups were isolated from the lung tissues. Staphylococci (23.8%) prevailed among gram-positive bacteria, *Escherichia coli* (32.1%) – among gram-negative bacteria. *Streptococcus pneumoniae* made up 0.3%. Based on data from bacteriological tests, the proportion of pneumonias of undetermined etiology was 0.7%. Besides, bacterial associations, two- or three-component ones as a rule, were detected in the tests of lung tissue samples. The most frequent combinations of associative pathogens were the following: *Escherichia coli* + *Proteus* spp. (24.7%), *Staphylococcus aureus* + *Escherichia coli* (19.6%), *Staphylococcus* spp. + *Enterococcus* spp. + *Escherichia coli* (35.5%), *Staphylococcus* spp. + *Escherichia coli* + *Proteus* spp. (21.2%). Almost all the enterobacteria detected have a high associativity coefficient

and occur mainly in the form of associations. The analysis of the study results showed that practically any microorganism alone or in combination can cause pneumonia in an animal with a weakened immunity; therefore, the effect of microbiota should not be underestimated. Also, significance of associative microbes in the development of pneumonia in captive monkeys is increasing.

Keywords: monkeys, pneumonia, polysegmental bronchopneumonia, croupous pneumonia, bacterial agents, microbial associations

For citation: Kalashnikova V. A., Rudenko N. S. Bacteriology and pathological anatomy of pneumonias in monkeys. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (1): 42–48. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-42-48.

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

For correspondence: Victoria A. Kalashnikova, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Infectious Pathology, FSBSI "RIMP", 354376, Russia, Krasnodar Krai, Sochi, s. Veseloye, ul. Mira, 177, e-mail: vikky.aw@gmail.com.

ВВЕДЕНИЕ

Патология респираторного тракта является одной из распространенных групп заболеваний. Пневмония, входящая в эту группу, представляет собой воспалительный процесс в легочных структурах, развивающийся на фоне различных факторов. В большинстве случаев возникает вследствие аспирации условно-патогенной микрофлоры из ротоглотки в нижние дыхательные пути. Поэтому можно сказать, что пневмония – это полиэтиологическое заболевание преимущественно бактериальной, бактериально-вирусной или вирусной природы. Наиболее частыми бактериальными возбудителями являются *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*. В настоящее время в этиологической структуре значимых агентов наряду с данными патогенными микроорганизмами стали часто встречаться условно-патогенные бактерии (энтеробактерии, коагулазоотрицательные стафилококки и др.). Однако из множества видов микроорганизмов, колонизирующих верхние дыхательные пути, не многие способны проникать в легкие, вызывая воспалительную реакцию. Различные патогены могут вызывать пневмонию как самостоятельно, так и в ассоциации с другими микроорганизмами, поэтому некоторые авторы подчеркивают полимикробный характер этого заболевания [1, 2]. Наибольший процент летальных исходов происходит от пневмоний, вызванных *St. aureus* и *K. pneumoniae* [3]. Принимая во внимание инфекционную природу пневмонии, актуальным является изучение спектра ее возбудителей.

Пневмонией болеют все животные, но чаще всего крупный и мелкий рогатый скот, лошади, кошки, китообразные. Причины ее возникновения – условия жизни (содержание животных в неблагоприятных условиях), переохлаждение, авитаминоз, плохое питание и, как следствие, ослабление защитных сил организма. Особенно часто заболеванию подвержены новорожденные и детеныши до года.

В настоящее время одной из важных проблем приматологии является пневмония, что обусловлено не только высокой частотой ее регистрации среди обезьян, живущих в условиях неволи, но и высокими показателями летальности, особенно у детенышей возрастом до 1 месяца. В питомниках и зоопарках различных

стран мира от пневмонии погибают до 20–50% поголовья обезьян [4, 5]. Она может возникать первично, а также осложнять течение других заболеваний. Особенности этиологии и патогенеза пневмоний обезьян, содержащихся в условиях неволи, требуют дальнейшего детального изучения. В литературе имеются сообщения, подчеркивающие близкое сходство пневмонии человека и обезьян [6].

Цель работы – провести анализ гибели обезьян от пневмоний, определить спектр бактериальных патогенов как возможных возбудителей инфекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В период с 2019 по 1-е полугодие 2021 г. были проведены патолого-анатомические исследования 866 погибших обезьян обоего пола шестнадцати видов (табл. 1), обитавших в питомнике ФГБНУ «НИИ МП». Возраст погибших особей, переданных в прозекторский отдел, был от 0 дней (новорожденные) до 35 лет. По данным результатов исследований, общая смертность обезьян в 2019 г. составила 355 особей, в 2020 г. – 316, в первом полугодии 2021 г. – 195. В данном исследовании не принимали во внимание мертворождения, случаи с трупным разложением и эвтаназией.

У 377 животных поставлен патоморфологический диагноз пневмония, который являлся главным или сопутствующим. Предварительный диагноз устанавливался макроскопически при патолого-анатомическом вскрытии. В большинстве случаев он подтверждался после гистологического исследования с небольшими дополнениями и уточнениями.

Аутопсийным материалом для исследования служили кусочки легких, взятые у погибших обезьян из морфологически измененных участков органов. Часть материала фиксировали по общепринятой методике в забуференном 10%-м формалине. Изготавливали гистологические препараты с применением окраски гематоксилин-эозином. Материал изучался при помощи светового микроскопа.

Бактериологическое исследование проводили параллельно. Для обнаружения бактериальной микрофлоры в легких осуществляли посев методом отпечатков, а также в сахарный бульон, из которого через 24 ч делали высев на дифференциально-диагностические среды. Для изоляции различных групп

Таблица 1
Характеристика погибших обезьян

Table 1
Characteristics of dead monkeys

Вид обезьян	Возраст						Всего
	до 1 мес.	1 мес. – 1 год	1–3 года	3–10 лет	10–15 лет	15 и более лет	
Макак-резус	29	19	43	87	49	63	290
Макак яванский	48	21	19	70	29	41	228
Макак лапундер	5	2	–	5	5	6	23
Мартышка зеленая	6	3	4	10	4	7	34
Павиан анубис	18	3	10	27	12	10	80
Павиан гамадрил	69	23	16	43	18	22	191
Макак ассамский	–	–	–	–	1	1	2
Макак бурый	–	–	–	–	–	2	2
Макак черный	–	–	–	–	–	1	1
Мартышка мона	–	–	–	–	–	1	1
Мангобей черный	–	1	–	–	–	–	1
Капуцин бурый	2	–	2	–	–	1	5
Капуцин белоплечий	2	–	–	–	–	–	2
Магот	–	–	–	–	–	1	1
Патас	–	–	2	1	–	1	4
Гиббон	–	–	1	–	–	–	1
Итого	179	72	97	243	118	157	866

микроорганизмов использовали желточно-солевой агар, среду Эндо, 5%-й кровяной агар, как описано ранее [7]. Идентификацию выделенных культур проводили на основании морфологии и биохимических свойств. В качестве критерия при определении частоты встречаемости микробных ассоциаций и участия бактерий в них вычисляли коэффициент ассоциативности (КА):

$$КА = \frac{\text{число культур} - \text{ассоциантов определенного вида}}{\text{общее число культур этого вида}} \times 100\%.$$

При КА менее 50% (низкий критерий) микроорганизмы встречаются в основном в монокультурах; при КА 50–79% (средний критерий) – чаще в виде ассоциантов; при КА 80–100% (высокий критерий) – в основном в виде ассоциаций.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из общего числа погибших обезьян в период с 2019 по 1-е полугодие 2021 г. у 377 (43,5%) из них поставлен патоморфологический диагноз пневмония, что подтверждалось различными проявлениями воспаления и локацией пораженных участков органа: уплотнением ткани легкого, потемнением участков, выделением катара на слизистой оболочке трахеи и бронхов (табл. 2). Чаще всего сопутствующим диагнозом при пневмониях у взрослых особей определяли хронический атрофический гастроэнтероколит на фоне общего истощения и обезвоживания организма.

Принимая во внимание численность каждого вида погибших обезьян, наибольший процент гибели от пневмоний был отмечен у павианов гамадрилов (28,4%), макаков яванских и макаков-резусов (27,3 и 24,9% соответственно) (табл. 2). Наблюдения показали, что смертность животных не зависит от пола. Так, в данный период погибли 187 самцов и 190 самок. Анализ сезонной динамики показал, что резкого возрастания летальности обезьян от пневмоний в течение года не происходит.

Согласно данным таблиц 1 и 3, смертность детенышей до 1 месяца от пневмонии составила 90% (161 особь из 179). Также от пневмонии гибнут более половины детенышей до 1 года (42 из 72 особей) и 42,3% подростков до 3 лет (41 из 97 особей). При этом количество погибших от воспаления легких молодых обезьян в возрасте 3–10 лет (55 из 243 особей) снижается более чем в два раза по сравнению с подростками, и, как правило, в данном случае пневмонии становятся сопутствующим заболеванием. У зрелых и старых животных снова происходит подъем смертности, при этом основной причиной является пневмония. Самый высокий процент гибели от пневмонии (42,7%) без учета принадлежности к тому или иному виду выявился среди новорожденных и детенышей обезьян в возрасте от нескольких дней до месяца (табл. 3). Причем у павианов гамадрилов этот показатель оказался наибольшим (37,3%). В данной возрастной группе также

высока гибель у детенышей макаков яванских (30,4%). Процент гибели детенышей макаков-резусов увеличивается начиная с 1 месяца до 1 года (23,8%). У детенышей обезьян возрастом до 1 года пневмония обычно является единственным обнаруживаемым при макроскопическом исследовании заболеванием. Смертность взрослых и старых обезьян рода макаков (макаки-резусы и макаки яванские) находится приблизительно на одном уровне, в то время как у павианов этот показатель с возрастом снижается.

В большинстве случаев у погибших обезьян был поставлен диагноз двусторонняя полисегментарная бронхопневмония (94,4%). В 4,5% случаев наблюдалась крупозная пневмония.

При патолого-анатомическом вскрытии слизистая оболочка трахеи и крупных бронхов оказывается набухшей, полнокровной, со множеством мелкоточечных кровоизлияний (рис. 1).

Микроскопически в очагах воспаления отмечались различные количественные соотношения клеточных элементов (нейтрофильных лейкоцитов, лимфоцитов, слизистых альвеолярных клеток) и эритроцитов (рис. 2).

Преобладали мелкоочаговые и сливающиеся формы серозной пневмонии. В экссудате, как правило, обнаруживались свободные или фагоцитированные диплококки. Поражения бронхов носили характер десквамативного или язвенного бронхита. В просвете бронхов выявлялась смешанная микрофлора, представленная кокками. Указанные изменения в легких часто сочетались со множественными ателектазами. При крупозной пневмонии макроскопически отмечалось поражение одной или нескольких долей легкого, в альвеолах обнаруживался фибринозный экссудат, а на плевре – фибриновые наложения (плевропневмония), в экссудате преобладал фибрин. У обезьян, не достигших 6-месячного возраста, пневмонии характеризовались генерализацией процесса по всему легкому с бактериемией и гнойным воспалением мозговых оболочек. Лобарная и бронхопневмония являются классическими анатомическими категориями бактериальной пневмонии и имеют морфологические особенности, зависящие от вида инфекционного агента, и в этих случаях бактериологические исследования играют ключевую роль в установлении этиологии инфекционных процессов.

Всего при бактериологическом исследовании легких обезьян выделено 899 культур микроорганизмов, при этом доля грамположительной микрофлоры составила 45,1% (405 культур) и грамотрицательной – 54,9% (494 культуры). В 0,7% случаев (7 образцов легких) на питательных средах рост отсутствовал. Анализ микробного пейзажа показал, что первое место по частоте встречаемости занимали представители семейства *Enterobacteriaceae* (54,1%), неферментирующие грамотрицательные бактерии высеваны в 0,2% и *Pseudomonas aeruginosa* – в 0,7% случаев. Среди кокковой флоры чаще встречались стафилококки (23,8%), при этом удельный вес *St. aureus* составил 16,8%, *Enterococcus* spp. – 15,2% и только в 0,3% случаев обнаружен *St. pneumoniae*. Среди энтеробактерий чаще высевались *Escherichia coli* (32,1%). Удельный вес остальных энтеробактерий был невысок (рис. 3).

Выделенные при пневмониях энтеробактерии рода *Klebsiella* (2,6%) представлены тремя видами:

Таблица 2
Количество разных видов обезьян, погибших в период с 2019 по 2021 г. (1-е полугодие) от пневмоний различной этиологии

Table 2
Number of monkeys (by species) that died of pneumonias of different etiology between 2019 and the first half of 2021

Вид обезьян	Количество животных (%)			Всего
	2019 г.	2020 г.	1-е полугодие 2021 г.	
Макак-резус	42 (44,7)	30 (31,9)	22 (23,4)	94 (24,9)
Макак яванский	42 (40,8)	43 (41,7)	18 (17,5)	103 (27,3)
Макак лапундер	6 (35,3)	9 (52,9)	2 (11,8)	17 (4,5)
Мартышка зеленая	5	5	–	10 (2,7)
Павиан анубис	19 (54,2)	8 (22,9)	8 (22,9)	35 (9,3)
Павиан гамадрил	42 (39,3)	40 (37,4)	25 (23,3)	107 (28,4)
Макак ассамский	2	–	–	2 (0,5)
Магот	1	–	–	1 (0,3)
Патас	2	–	–	2 (0,5)
Капуцин бурый	1	1	2	4 (1,1)
Капуцин белоплечий	–	2	–	2 (0,5)
Итого	162 (43,0)	138 (36,6)	77 (20,4)	377

Таблица 3
Возрастная структура погибших от пневмоний обезьян

Table 3
Age structure of monkeys that died of pneumonias

Вид обезьян	Количество животных (%)					
	до 1 мес.	1 мес. – 1 год	1–3 года	3–10 лет	10–15 лет	15 и более лет
Макак-резус	24 (14,9)	10 (23,8)	15 (36,6)	20 (36,4)	13 (34,2)	12 (30,0)
Макак яванский	49 (30,4)	12 (28,6)	8 (19,5)	14 (25,5)	8 (21,1)	12 (30,0)
Макак лапундер	5 (3,1)	1 (2,4)	–	5 (9,1)	3 (7,9)	3 (7,5)
Мартышка зеленая	5 (3,1)	–	–	2 (3,6)	–	3 (7,5)
Павиан анубис	15 (9,3)	–	4 (9,8)	5 (9,1)	8 (21,1)	3 (7,5)
Павиан гамадрил	60 (37,3)	18 (42,8)	11 (26,8)	8 (14,5)	5 (13,1)	5 (12,5)
Макак ассамский	–	–	–	1 (1,8)	–	1 (2,5)
Магот	–	–	–	–	1 (2,6)	–
Патас	–	–	2 (4,9)	–	–	–
Капуцин бурый	1 (0,6)	1 (2,4)	1 (2,4)	–	–	1 (2,5)
Капуцин белоплечий	2 (1,3)	–	–	–	–	–
Всего	161 (42,7)	42 (11,1)	41 (10,9)	55 (14,6)	38 (10,1)	40 (10,6)

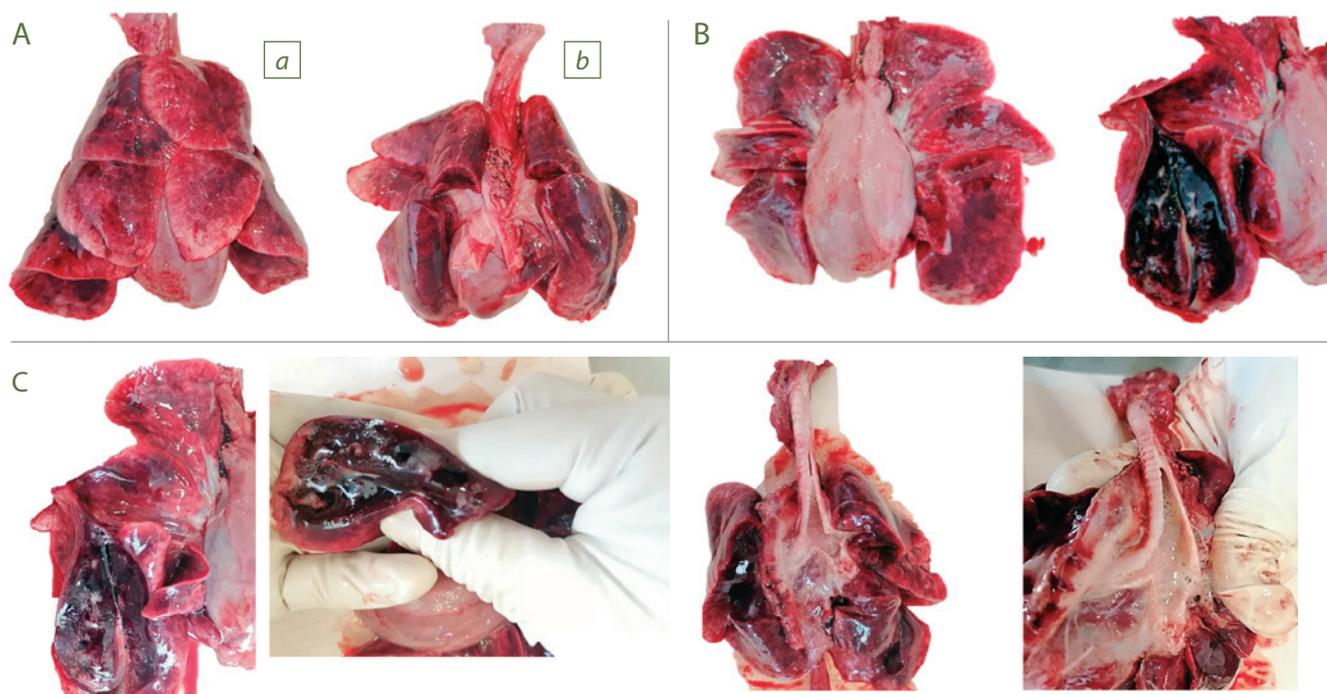


Рис. 1. Двусторонняя полисегментарная бронхопневмония (макроскопические изменения в легких) у макака-резуса (4-летний самец):

A – вентральная (a) и дорсальная (b) поверхности легких;
 B – нижняя доля правого легкого;
 C – альвеолярный отек легких

Fig. 1. Bilateral polysegmental bronchopneumonia (gross lung lesions) in a 4-year-old male rhesus macaque:

A – ventral (a) and dorsal (b) surfaces of lungs;
 B – lower lobe of the right lung;
 C – pulmonary alveolar edema

K. pneumonia (10 изолятов), *K. oxytoca* (11 изолятов), *K. ozaenae* (2 изолята). Среди представителей рода *Enterobacter* (2,5%) по частоте встречаемости лидируют *E. cloacae* (7 изолятов) и *E. aerogenes* (6 изолятов), реже обнаруживали *E. gergoviae* (3 изолята), *E. agglomerans* (4 изолята). В 1,2% случаев выявлены бактерии рода *Citrobacter*, при этом количество изолятов *C. freundii* составило 8, *C. diversus* – 2 и *C. farmeri* – 1. Представители

рода *Providencia* выделены в 0,7% случаев: *P. stuartii* (5 изолятов), *P. rettgeri* (1 изолят). В единичных случаях были высеяны и другие энтеробактерии – *Erwinia* spp. (2 изолята), *Hafnia alvei* (2 изолята), *Serratia* spp. (1 изолят). Доля обнаруженных *Bacillus* spp. составила 0,6%, других неидентифицированных грамположительных палочек – 4,3%. Как видно из таблицы 4, выделенная микрофлора в 13,4% случаев была представлена монокультурами, тогда как остальные бактерии входили в состав ассоциаций (86,6%), которые включали от 2 до 6 микроорганизмов.

В результате проведенных исследований отмечено возрастание числа ассоциаций, так, в 2019 г. выделено 142 ассоциации, а за первое полугодие 2021 г. – 138 микробных ассоциаций. Лидирующее положение заняли двухкомпонентные ассоциации (58,4%).

Также встречались трех-, четырех-, пятикомпонентные ассоциации (29,8; 10,3; 1,2% соответственно), выявлена одна шестикомпонентная ассоциация (0,3%). В таблице 5 представлено количество наиболее часто

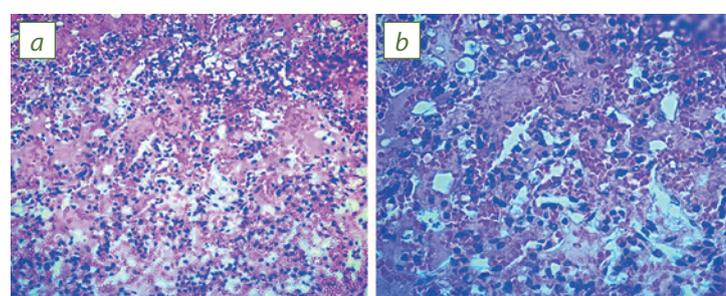


Рис. 2. Двусторонняя полисегментарная бронхопневмония (микроскопические изменения в легких) у макака-резуса (4-летний самец). Окраска гематоксилином и эозином, увеличение ×100 (a) и ×200 (b)

Fig. 2. Bilateral polysegmental bronchopneumonia (microscopic lung lesions) in a 4-year-old male rhesus macaque. Hematoxylin and eosin staining, 100× (a) and 200× (b) magnification

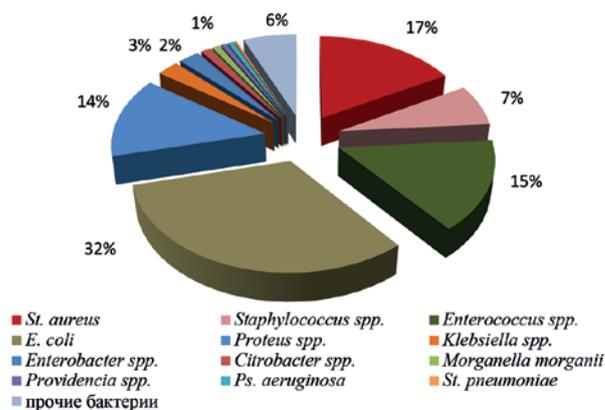


Рис. 3. Структура выделенных бактериальных культур при пневмониях у обезьян

Fig. 3. Structure of bacterial cultures isolated from pneumonia affected monkeys

регистрируемых бактериальных ассоциаций. Как видно, из двухкомпонентных ассоциаций наиболее часто обнаруживалось сочетание *E. coli* + *Proteus* spp. (24,7%), среди трехкомпонентных – *Staphylococcus* spp. + *Enterococcus* spp. + *E. coli* (35,5%). Другие комбинации представлены в единичных случаях.

При выявлении частоты встречаемости микроорганизмов в составе ассоциаций произвели расчет коэффициента ассоциативности (КА). Выделенные при пневмониях бактерии характеризовались средним и высоким КА. Средний КА отмечен у *E. coli* (58%), остальные имели высокий КА – от 67% у *Ps. aeruginosa* до 100% у *Providencia* spp. и *Citrobacter* spp.

Недостатком проведенной работы было отсутствие диагностики *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydia pneumoniae*. Однако, согласно проведенным ранее исследованиям, данные патогены могут присутствовать в тканях легких обезьян при пневмониях [8]. По неопубликованным данным лаборатории инфекционной вирусологии ФГБНУ «НИИ МП», за период с 2019 по июнь 2021 г. респираторные вирусы при пневмониях у обезьян не выявлены. Ранее проведенные молекулярно-генетические исследования *St. aureus* позволяют говорить об их высокой патогенности и расценивать как этиологически значимые возбудители пневмоний у обезьян [9]. Выделение из легочной ткани представителей таких энтеробактерий, как *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Hafnia alvei*, *Serratia* spp., *Erwinia* spp., а также в большинстве случаев *E. coli*, скорее свидетельствует о контаминации исследуемого материала *post mortem*, чем об этиологической значимости этих бактерий. Однако, анализируя полученные данные, можно отметить, что практически любой микроорганизм изолированно или в комбинации может привести к развитию пневмонии при ослаблении иммунитета животного, в связи с чем нельзя недооценивать влияние микрофлоры и можно говорить о возрастающей роли микробов-ассоциантов в развитии пневмонии [2].

ВЫВОДЫ

Таким образом, в результате проведенного исследования сделаны следующие выводы:

1. У низших приматов различных видов, содержащихся в условиях неволи, часто регистрируются заболевания нижних дыхательных путей (пневмонии), которые имеют различную этиологию. В разные годы прослеживается некоторая динамика заболеваний относительно пола и возраста, что, скорее всего, связано с погодными условиями и численной плотностью обезьян в вольерах или клетках.

2. Заболеваемость пневмонией у детенышей протекает быстро и приводит к летальному исходу.

3. Часто заболеваемость пневмонией у взрослых обезьян является сопутствующей при желудочно-кишечной патологии.

4. В структуре поражений легких при пневмониях у обезьян преобладают долевы, полисегментарные процессы (94,4%).

5. Воспаление легких при патолого-анатомическом исследовании погибших приматов определяется классическими признаками: наличием экссудата, изменением цвета (воспалительная гиперемия) и уплотнением пораженного участка. Все изменения носят запущен-

Таблица 4
Частота выделения монокультур и микробных ассоциаций из легких обезьян при пневмониях

Table 4
Frequency of isolation of monocultures and microbial associations from the lungs of pneumonia affected monkeys

Микроорганизм	Всего	Моноинфекция, абс. число (%)	Ассоциации, абс. число (%)
<i>Staphylococcus</i> spp.	63	10 (15,9)	53 (84,1)
<i>St. aureus</i>	151	4 (2,7)	147 (97,3)
<i>E. coli</i>	288	57 (19,8)	231 (80,2)
<i>Proteus</i> spp.	122	5 (4,1)	117 (95,9)
<i>Ps. aeruginosa</i>	6	2 (33,3)	4 (66,7)
<i>Bacillus</i> spp.	6	2 (33,3)	4 (66,7)
<i>Enterococcus</i> spp.	137	40 (29,2)	97 (70,8)

Таблица 5
Варианты наиболее распространенных сочетаний микроорганизмов в легких при пневмониях у обезьян

Table 5
Variants of most common combinations of microorganisms in the lungs of pneumonia affected monkeys

Двух- и трехкомпонентные ассоциации	Абс. число, (%)
<i>E. coli</i> + <i>Proteus</i> spp.	48 (24,7)
<i>St. aureus</i> + <i>E. coli</i>	38 (19,6)
<i>St. aureus</i> + <i>Enterococcus</i> spp.	21 (10,8)
<i>E. coli</i> + <i>Enterococcus</i> spp.	19 (9,8)
<i>St. aureus</i> + <i>Proteus</i> spp.	16 (8,3)
<i>E. coli</i> + <i>Enterobacter</i> spp.	10 (5,2)
Прочие комбинации	42 (21,6)
Всего	194
<i>Staphylococcus</i> spp. + <i>Enterococcus</i> spp. + <i>E. coli</i>	35 (35,4)
<i>Staphylococcus</i> spp. + <i>E. coli</i> + <i>Proteus</i> spp.	21 (21,2)
Прочие комбинации	43 (43,4)
Всего	99

ный характер и являются наглядным примером классической картины заболеваний с таким диагнозом, как двусторонняя полисегментарная бронхопневмония и крупозная пневмония.

6. В результате бактериологического исследования тканей легких обезьян, погибших от пневмоний, выявлены различные бактериальные патогены и их комбинации. Удельный вес *St. aureus* в структуре микробного пейзажа составил 16,8%, *Enterococcus* spp. – 15,2%, *St. pneumoniae* – 0,3%. Среди энтеробактерий чаще высевались *E. coli* (32,1%). Из микробных ассоциаций наиболее часто регистрировали сочетания *E. coli* + *Proteus* spp. (24,7%), *Staphylococcus* spp. + *Enterococcus* spp. + *E. coli* (35,4%). Практически все энтеробактерии выявлены в качестве ассоциантов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коржова Н. В., Белованская М. Н., Войтсеховский В. В. Особенности этиологической структуры нозокомиальной пневмонии и спектр чувствительности наиболее распространенных возбудителей у пациентов многопрофильного стационара. *Амурский медицинский журнал*. 2018; 4 (24): 41–45. DOI: 10.22448/AMJ.2018.4.41-45.
2. Медведева Т. Я. Этиологические аспекты острой пневмонии у детей раннего возраста. *Педиатрия им. Г. Н. Сперанского*. 2008; 87 (1): 143–144. Режим доступа: https://pediatrajournal.ru/files/upload/mags/288/2008_1_2048.pdf.
3. Бедило Н. В., Воробьева Н. А., Исмаилова Н. В., Вещагина Н. А. Эпидемиология внебольничных пневмоний в городе Архангельске. *Экология человека*. 2013; 20 (8): 45–51. Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/epidemiologiya-vnebolnichnyh-pnevmoniy-v-gorode-archangelske>.
4. Kim J. C., Kalter S. S. A review of 105 necropsies in captive baboons (*Papio cynocephalus*). *Lab. Anim.* 1975; 9 (3): 233–239. DOI: 10.1258/00236775780994619.
5. Dick E. J. Jr., Owston M. A., David J. M., Sharp R. M., Rouse S., Hubbard G. B. Mortality in captive baboons (*Papio spp.*): a 23-year study. *J. Med. Primatol.* 2014; 43 (3): 169–196. DOI: 10.1111/jmp.12101.
6. Лапин Б. А., Джикидзе Э. К., Крылова Р. И., Стасилевич З. К., Яковлева Л. А. Проблемы инфекционной патологии обезьян. М.: Издательство РАМН. 2004. 140 с.
7. Калашникова В. А., Султанова О. А. Место *Staphylococcus aureus* в этиологической структуре возбудителей пневмоний у обезьян, содержащихся в Адлерском питомнике. *Астраханский медицинский журнал*. 2017; 12 (2): 36–43. Режим доступа: <http://astmedj.ru/index.php/amj/article/view/413>.
8. Калашникова В. А., Демерчян А. В. Анализ смертности от пневмонии обезьян, содержащихся в условиях неволи, и место метициллинчувствительного *Staphylococcus aureus* (MSSA) в спектре выделенной микрофлоры. *Ветеринария сегодня*. 2018; (3): 58–62. DOI: 10.29326/2304-196X-2018-3-26-58-62.
9. Калашникова В. А. Вирулентные характеристики *Staphylococcus aureus*, выделенных при пневмониях у обезьян, живущих в условиях неволи. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2020; 3: 25–33. DOI: 10.29296/2618723X-2020-03-04.

REFERENCES

1. Korzhova N. V., Belovanskaya M. N., Voytsekhovskiy V. V. Features of the etiologic structure of the non-hospital pneumonia and the sensitivity spectrum of the largest distributors in the patients of multi-profiling stationer. *Amur Medical Journal*. 2018; 4 (24): 41–45. DOI: 10.22448/AMJ.2018.4.41-45. (in Russ.)
2. Medvedeva T. Ya. Etiological aspects of acute infantile. *Pediatrics named after G. N. Speransky*. 2008; 87 (1): 143–144. Available at: https://pediatrajournal.ru/files/upload/mags/288/2008_1_2048.pdf. (in Russ.)
3. Bedilo N. V., Vorobyova N. A., Ismaylova N. V., Veshchagina N. A. Epidemiology of community-acquired pneumonia in Arkhangelsk. *Ekologiya cheloveka (Human Ecology)*. 2013; 20 (8): 45–51. DOI: 10.33396/1728-0869-2013-8-45-51. (in Russ.)
4. Kim J. C., Kalter S. S. A review of 105 necropsies in captive baboons (*Papio cynocephalus*). *Lab. Anim.* 1975; 9 (3): 233–239. DOI: 10.1258/00236775780994619.
5. Dick E. J. Jr., Owston M. A., David J. M., Sharp R. M., Rouse S., Hubbard G. B. Mortality in captive baboons (*Papio spp.*): a 23-year study. *J. Med. Primatol.* 2014; 43 (3): 169–196. DOI: 10.1111/jmp.12101.
6. Lapin B. A., Dzhikidze E. K., Krylova R. I., Stasilevich Z. K., Yakovleva L. A. Problemy infektsionnoi patologii obez'yan = Problems of infectious pathology of monkeys. Moscow: Izdatel'stvo RAMN. 2004. 140 p. (in Russ.)
7. Kalashnikova V. A., Sultanova O. A. Place of *Staphylococcus aureus* in etiologic structure of pneumonia pathogens in monkeys kept in Adler monkey farm. *Astrakhan medical journal*. 2017; 12 (2): 36–43. Available at: <http://astmedj.ru/index.php/amj/article/view/413>. (in Russ.)
8. Kalashnikova V. A., Demerchyan A. V. Analysis of pneumonia-associated mortality of monkeys in captivity and the role of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) in the recovered microflora spectrum. *Veterinary Science Today*. 2018; (3): 58–62. DOI: 10.29326/2304-196X-2018-3-26-58-62.
9. Kalashnikova V. A. Virulent characteristics of *Staphylococcus aureus*, isolated from pneumonia in captive monkeys. *Laboratory Animals for Science*. 2020; 3: 25–33. DOI: 10.29296/2618723X-2020-03-04. (in Russ.)

Поступила в редакцию / Received 05.10.2021

Доработана после рецензирования / Revised 26.11.2021

Принята к публикации / Accepted 08.12.2021

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Калашникова Виктория Алексеевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории инфекционной патологии ФГБНУ «НИИ МП», г. Сочи, Россия.

Руденко Наталья Сергеевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории патологической анатомии ФГБНУ «НИИ МП», г. Сочи, Россия.

Victoria A. Kalashnikova, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Infectious Pathology, FSBSI "RIMP", Sochi, Russia.

Natalia S. Rudenko, Candidate of Science (Biology), Researcher, Laboratory of Pathological Anatomy, FSBSI "RIMP", Sochi, Russia.



Применение реакции иммунодиффузии как один из способов послеубойной диагностики лейкоза крупного рогатого скота

А. Р. Мустафаев

Прикаспийский зональный научно-исследовательский ветеринарный институт – филиал ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Республики Дагестан» (Прикаспийский зональный НИВИ – филиал ФГБНУ «ФАНЦРД»), Республика Дагестан, г. Махачкала, Россия;
<http://orcid.org/0000-0002-5142-8360>, e-mail: mustafaev_arkif@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Предложен новый способ послеубойной диагностики лейкоза крупного рогатого скота с применением реакции иммунной диффузии в геле агара. Предлагаемый метод позволяет выявлять антитела к антигену вируса лейкоза крупного рогатого скота, находящиеся в мышечно-тканевой жидкости (в плазме и лимфе) мяса и субпродуктов. Послеубойный отбор проб производили стерильным ватным тампоном путем смыва из разных частей туши и органов как заведомо серонегативных, так и не исследованных прижизненно животных. Полученные образцы биологического материала доставляли с сопроводительными документами в лабораторию. В пробирку со смывом добавляли от 0,5 до 0,7 мл изотонического раствора (0,85%-й раствор хлорида натрия) и оставляли на 3–5 ч для перехода в однородную субстанцию, выдерживали при температуре 18–26 °С и периодически встряхивали, чтобы антитела к вирусу лейкоза крупного рогатого скота со смыва переходили в физиологический раствор для дальнейшей постановки реакции иммунодиффузии. Учет результатов при проведении реакции проводили визуально путем выявления линий преципитации. При исследовании 175 образцов биологического материала от животных, не исследованных прижизненно на лейкоз крупного рогатого скота, серологическим методом положительный на лейкоз результат был получен в 5 (2,9%) случаях. При постановке реакции иммунодиффузии с пробами смывов с тканевой (лимфатической) жидкости, отобранными от 148 животных, которые на основании ветеринарных справок были прижизненно серонегативными к вирусу лейкоза крупного рогатого скота, получили отрицательные результаты. Таким образом, применение реакции иммунодиффузии может стать одним из способов послеубойной диагностики лейкоза крупного рогатого скота наряду с патолого-анатомическими, гистологическими, молекулярно-генетическими методами.

Ключевые слова: лейкоз крупного рогатого скота, послеубойная диагностика, реакция иммунодиффузии, серология, однородная субстанция

Для цитирования: Мустафаев А. Р. Применение реакции иммунодиффузии как один из способов послеубойной диагностики лейкоза крупного рогатого скота. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (1): 49–52. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-49-52.

Конфликт интересов: Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Мустафаев Аркиф Рамазанович, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории инфекционной патологии сельскохозяйственных животных, Прикаспийский зональный НИВИ – филиал ФГБНУ «ФАНЦРД», 367000, Россия, Республика Дагестан, г. Махачкала, ул. Дахадаева, 88, e-mail: mustafaev_arkif@mail.ru.

Immunodiffusion assay as a method of bovine leukosis post-mortem diagnosis

A. R. Mustafayev

Caspian Regional Research Veterinary Institute – Branch of Dagestan Agriculture Science Center, Makhachkala, Republic of Dagestan, Russia;
<http://orcid.org/0000-0002-5142-8360>, e-mail: mustafaev_arkif@mail.ru

SUMMARY

New method of post-mortem diagnosis of bovine leukosis is proposed and it involves use of agar gel immunodiffusion assay. The proposed method allows for the detection of antibodies against bovine leukemia virus (BLV) antigen located in the muscle and tissue fluids (plasma and lymph) of meat and offal. Post-mortem sampling was performed by dragging sterile cotton swabs across different parts of carcass and organs of both animals known to be seronegative and animals not tested alive. The collected samples and accompanied documents were submitted to the laboratory. 0.5–0.7 ml of isotonic solution (0.85% sodium chloride solution) were added to the tube with the swabs and the tube was left for 3–5 hours at 18–26 °C until homogenous substance formation. The tube was occasionally shaken so that BLV antibodies moved to the normal saline solution for further immunodiffusion assay. The assay results were visually recorded by detection of precipitation lines. Testing of 175 samples collected from animals not serologically tested for bovine leukosis before slaughter demonstrated five positive results (2.9%). Immunodiffusion assay of the tissue (lymphatic) fluid swabs collected from 148 animals, declared BLV seronegative alive in the veterinary certificates, demonstrated negative results. Therefore, along with autopsy, histological, molecular and genetic methods the immunodiffusion assay can be one of the tools for post-mortem diagnosis of bovine leukosis.

Keywords: bovine leukosis, post-mortem diagnosis, immunodiffusion assay, serology, homogenous substance

For citation: Mustafayev A. R. Immunodiffusion assay as a method of bovine leucosis post-mortem diagnosis. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (1): 49–52. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-49-52.

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

For correspondence: Arkif R. Mustafayev, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Infectious Pathology of Farm Animals, Caspian Regional Research Veterinary Institute – Branch of Dagestan Agriculture Science Center, 367000, Russia, Republic of Dagestan, Makhachkala, ul. Dakhadava, 88, e-mail: mustafayev_arkif@mail.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Лейкоз крупного рогатого скота вызывается вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) семейства *Retroviridae*. По данным международного комитета по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV¹), к семейству *Retroviridae* с 2020 г. относится 68 видов, 11 родов и два подсемейства: *Orthoretrovirinae* и *Spumaretrovirinae*. Подсемейство *Orthoretrovirinae* включает шесть родов: *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Lentivirus*; подсемейство *Spumaretrovirinae* – пять родов: *Bovispumavirus*, *Equispumavirus*, *Felisumavirus*, *Prosimiispumavirus*, *Simiispumavirus*. *Bovine leukemia virus*, или ВЛКРС, относится к роду *Deltaretrovirus*, в который помимо ВЛКРС входят еще три вида: Т-лимфотропные вирусы приматов (HTLV-I, HTLV-II, HTLV-III) [1–3]. В организме животного ВЛКРС поражает кроветворные и лимфоидные ткани, вовлекая в патологический процесс костный мозг, селезенку, лимфатические узлы и т. д. В поздней стадии болезни поражаются и другие органы животного (желудок, печень, кишечник, легкие и т. д.) путем пролиферации и малигнизации бластных клеток [4–6].

Прижизненный диагноз на лейкоз крупного рогатого скота в ветеринарных лабораториях ставится различными способами: серологическими – с применением иммуноферментного анализа (ИФА) и реакции иммунодиффузии в геле агара (РИД); молекулярно-генетическим – с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также гематологическим, клиническим и цитоморфологическим методами [7–9].

Посмертный диагноз на лейкоз крупного рогатого скота устанавливается на основании патолого-анатомических и гистологических исследований павших или вынужденно убитых животных. После вскрытия трупов фиксируются патолого-анатомические изменения в органах и тканях в зависимости от формы течения и характера лейкозного поражения. При лимфоидном лейкозе увеличиваются в размере селезенка, лимфатические узлы, а также наблюдается метаплазия костного мозга. В поздней стадии лимфоидная гиперплазия отмечается и в других органах. При моноцитарном лейкозе в начальной стадии патолого-анатомические изменения отсутствуют, а на поздней стадии увеличиваются лимфатические узлы, которые часто срастаются друг с другом. При остром течении гемоцитобластоз-

ной формы лейкоза происходит увеличение размера и массы селезенки и лимфатических узлов. В случае лейкоза крупного рогатого скота миелоидной формы патолого-анатомические изменения наблюдаются в лимфатических узлах, селезенке и печени, при этом обнаруживаются очаги миелоидных клеток.

При проведении патолого-анатомических исследований не всегда можно обнаружить патологические изменения в органах животных, особенно на ранних стадиях заболевания. Дифференцировать лейкоз крупного рогатого скота от многих других заболеваний (актиномикоза, туберкулеза, паратуберкулеза, бруцеллеза и т. д.) иногда не удается. Если патологическая картина заболевания недостаточно ясна, то диагноз необходимо уточнить лабораторными методами путем изготовления гистологических препаратов из органов и мышц животных и изучения их с помощью световых или электронных микроскопов [10–12].

Не менее важным способом в постановке послеубойного диагноза на лейкоз крупного рогатого скота является молекулярно-генетический метод с применением ПЦР. Данный метод применим как в прижизненной, так и в послеубойной диагностике лейкоза крупного рогатого скота. С помощью ПЦР в пробах крови или мышечной ткани животного можно обнаружить ДНК провируса лейкоза крупного рогатого скота.

В связи со сложностью проведения вышеуказанных (патолого-анатомических, гистологических, молекулярно-генетических) исследований становится актуальным применение РИД как нового способа в послеубойной диагностике лейкоза крупного рогатого скота, что позволит упростить работу ветеринарным специалистам. Исходя из вышеизложенного, была поставлена следующая цель: применить серологический метод послеубойной диагностики лейкоза крупного рогатого скота с использованием РИД.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для проведения послеубойной диагностики лейкоза крупного рогатого скота послужили 323 пробы, полученные из туш и субпродуктов (печени, селезенки, почек и т. д.) крупного рогатого скота с рынка № 2 г. Махачкалы Республики Дагестан. Из них 148 отобраны от животных, которые на основании ветеринарных справок (из ветеринарного участка) были прижизненно серонегативными, а 175 образцов – от особей, не исследованных прижизненно серологическим методом на ВЛКРС. Так как в мышечно-тканевой

¹ <https://talk.ictvonline.org>.

жидкости (плазме и лимфе) с помощью РИД выявляют антитела к антигену ВЛКРС, пробы были взяты стерильным ватным тампоном в виде смывов с поверхности и разрезов мышечных тканей туш, выполненных стерильным скальпелем. Полученные пробы для серологических исследований доставляли в лабораторию в стерильных пробирках с указанием номера, вида животного, даты, времени, места взятия смыва и т. д.

Послеубойные исследования туш и субпродуктов животных с помощью РИД проводили в лаборатории, используя набор для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота производства ФКП «Курская биофабрика» (Россия).

Пробы (смывы) с туш и внутренних органов отбирали согласно «Правилам ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов» [13], а серологические исследования проводили с применением «Методических указаний по диагностике лейкоза крупного рогатого скота» [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При отборе биоматериала для послеубойных исследований при взятии проб с туш и субпродуктов соблюдали все ветеринарно-санитарные требования. Полученные тампоны со смывами помещали в пронумерованные стерильные пробирки и доставляли в лабораторию инфекционной патологии сельскохозяйственных животных Прикаспийского зонального НИВИ с сопроводительными документами. До постановки РИД в пробирки со смывами добавляли однократно, в зависимости от размера сделанного тампона, от 0,5 до 0,7 мл изотонического раствора (0,85%-й раствор хлорида натрия) и оставляли их на 3–5 ч для перехода в однородную субстанцию. После этого пробирки с содержимым выдерживали при комнатной температуре (от 18 до 26 °С), периодически встряхивая (2–3 раза), чтобы содержащееся в смыве с инфицированных ВЛКРС туш антитела переходили в физиологический раствор.

Постановку РИД проводили следующим образом: в пробитые штампом в агаровом геле лунки из пробирки исследуемую субстанцию в объеме 0,04–0,06 мл с помощью автоматической пипетки (дозатора) вносят в лунки № 1, 3, 4, 6, предварительно несколько раз надавливая на тампон со смывом; центральную лунку № 7 заполняют антигеном ВЛКРС, а диаметрально расположенные периферические лунки № 2 и 5 – специфической преципитирующей сывороткой (рис.). Затем чашки Петри инкубируют в термостате при температуре 20–26 °С, учет реакции проводят визуально через 48 ч.

Прижизненная диагностика лейкоза крупного рогатого скота с применением РИД заключается в обнаружении специфических преципитирующих антител к ВЛКРС в сыворотке крови животных.

Для проведения оценки послеубойной диагностики лейкоза крупного рогатого скота с применением РИД исследовали 148 проб смывов тканевой (лимфатической) жидкости, диффундированной изотоническим раствором, полученных из туш и субпродуктов РИД-отрицательных к ВЛКРС животных, а также 175 проб, выборочно взятых от прижизненно не исследованных на лейкоз особей (таб.).

Как видно из таблицы, все 148 проб от животных, которые по результатам прижизненных исследований

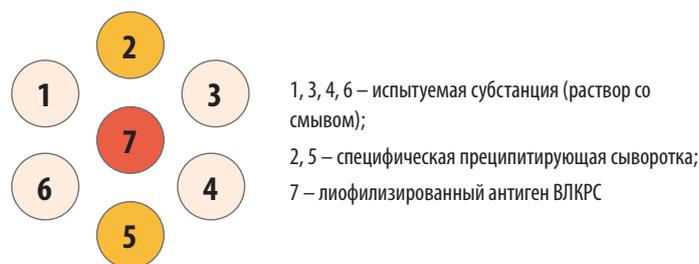


Рис. 1. Постановка РИД с испытуемой субстанцией для послеубойной диагностики лейкоза крупного рогатого скота

Fig. 1. ID assay of test substance for post-mortem diagnosis of bovine leukosis

были серонегативными к ВЛКРС, в послеубойной диагностике на лейкоз крупного рогатого скота дали отрицательный результат в РИД.

При исследовании 175 образцов биологического материала от животных, не исследованных прижизненно на лейкоз крупного рогатого скота, серологическим методом с применением РИД положительный на лейкоз результат был получен в 5 (2,9%) случаях на первый и второй дни взятия проб. На пятый день с момента отбора смывов антитела выявили только в 4 (2,3%) исследуемых пробах. Основной задачей проведения послеубойных исследований в разные сроки после отбора образцов (на 1, 2, 5-й дни) было установление факта снижения (сохранности) количества антител к антигену ВЛКРС в мышечно-тканевой жидкости (в лимфе и плазме) с помощью РИД.

Проведенные серологические исследования проб, полученных с поверхности, а также с разрезов мышечных тканей туш и субпродуктов животных, показывают, что РИД является недорогим и простым в применении способом послеубойной диагностики лейкоза крупного рогатого скота.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что реакцию иммунодиффузии, наряду с другими общепризнанными методами – патолого-анатомическим, гистологическим, молекулярно-генетическим с применением ПЦР, можно использовать как один из способов послеубойной диагностики лейкоза крупного рогатого в ветеринарно-санитарной экспертизе мяса.

Таблица

Прижизненная и послеубойная диагностика лейкоза крупного рогатого скота с применением серологического метода (РИД)

Table
Ante-mortem and post-mortem BL diagnosis using serological method (IDA)

Прижизненная диагностика лейкоза крупного рогатого скота	Всего исследовано в РИД, гол.	Послеубойная диагностика в РИД, сроки проведения исследований		
		1-й день	2-й день	5-й день
РИД-отрицательные к ВЛКРС	148	–	–	–
Не проводились серологические (иные) исследования для постановки диагноза на лейкоз крупного рогатого скота	175	5	5	4
Всего	323	5 (2,9%)	5 (2,9%)	4 (2,3%)

Таким образом, при проведении послеубойных исследований туш и субпродуктов на лейкоз крупного рогатого скота серологическим методом выявлена возможность применения РИД как одной из тест-систем для обнаружения антител к антигену ВЛКРС, находящегося в тканевой жидкости (в плазме и лимфе) и субпродуктах животных после убоя [15].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Забережный А. Д., Костина Л. В., Южакова А. Г., Гулюкина И. А., Степанова Т. В., Стаффорд В. В. и др. Современная таксономия вирусов. *Ветеринария и кормление*. 2017; 1: 4–13. Режим доступа: <http://vetkorm.ru/magasines/veterinariya-i-kormlenie-1-yanvar-fevral-2017g>.
2. Мустафаев А. Р., Джамбулатов З. М., Гаджиев Б. М. Изменение степени распространения лейкоза крупного рогатого скота за последние годы в Республике Дагестан. *Проблемы развития АПК региона*. 2020; 3 (43): 144–149. DOI: 10.15217/issn2079-0996.2020.3.144.
3. Gillet N., Florin A., Boxus M., Burteau C., Nigro A., Vandermeers F., et al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel antiretroviral therapies in human. *Retrovirology*. 2007; 4:18. DOI: 10.1186/17424690418.
4. Burny A., Cleuter Y., Kettmann R., Mammerickx M., Marbaix G., Portetelle D., et al. Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Cancer Surv*. 1987; 6 (1): 139–159. PMID: 2891439.
5. Meas S., Usui T., Ohashi K., Sugimoto C., Onuma M. Vertical transmission of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency virus in dairy cattle herds. *Vet. Microbiol*. 2002; 84 (3): 275–282. DOI: 10.1016/s0378-1135(01)00458-8.
6. Willems L., Burny A., Dangoisse O., Collete D., Dequiedt F., Gattot J. S., et al. Bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Curr. Top Virol*. 1999; 139–167. Corpus ID: 86336958.
7. Гулюкин М. И., Барабанов И. И., Иванова Л. А., Степанова Т. В., Козырева Н. Г., Симонян Г. А. и др. Мониторинг эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в товарных и племенных хозяйствах Российской Федерации за 2014–2015 годы. *Ветеринария и кормление*. 2016; 4: 5–41. Режим доступа: <http://vetkorm.ru/magasines/veterinariya-i-kormlenie-4-ijul-avgust-2016g>.
8. Донник И. М., Гулюкин М. И., Бусол В. А., Коваленко Л. В., Коваленко А. М. Лейкоз крупного рогатого скота – диагностика, оздоровление, антропоонозный потенциал (история вопроса) (обзор). *Сельскохозяйственная биология*. 2021; 56 (2): 230–244. DOI: 10.15389/agrobiolog.2021.2.230rus.
9. Мустафаев А. Р. Эпизоотическая обстановка по энзоотическому лейкозу крупного рогатого скота в общественных и индивидуальных хозяйствах Республики Дагестан. *Ветеринария сегодня*. 2021; (2): 144–150. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-2-37-144-150.
10. Симонян Г. А. Дифференциальная диагностика различных форм гемобластозов. *Ветеринария*. 2013; 9: 21–25. eLIBRARY ID: 20181890.
11. Симонян Г. А. Гематосаркомы – опухолевые формы проявления гемобластозов. *Ветеринария*. 2014; 5: 21–27. eLIBRARY ID: 21868783.
12. Симонян Г. А., Хисамудинов Ф. Ф. Ветеринарная гематология. М.: Колос; 1995. 256 с.
13. Правила ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов: утв. Минсельхозом СССР 27.12.1983. Режим доступа: <https://legalacts.ru/doc/pravila-veterinarnogo-osmotra-uboinykh-zhivotnykh-i-veterinarno-sanitarnoi>.
14. Методические указания по диагностике лейкоза крупного рогатого скота: утв. Департаментом ветеринарии МСХ РФ 23.08.2000 № 1372/2130. Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200118749>.
15. Мустафаев А. Р. Способ послеубойной диагностики лейкоза крупного рогатого скота. Патент № 2744706 Российская Федерация, МПК G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/531 (2006.01). ФГБНУ «Федераль-

ный аграрный научный центр Республики Дагестан». № 2020103451. Заявл. 27.01.2020. Оpubл. 15.03.2021. Бюл. № 8.

REFERENCES

1. Zaberezhny A. D., Kostina L. V., Yuzhakova A. G., Gulyukina I. A., Stepanova T. V., Stafford V. V., et al. Modern taxonomy of viruses. *Veterinaria i kormlenie*. 2017; 1: 4–13. Available at: <http://vetkorm.ru/magasines/veterinariya-i-kormlenie-1-yanvar-fevral-2017g>. (in Russ.)
2. Mustafayev A. R., Dzhambulatov Z. M., Gadzhiev B. M. Changes in the degree of spread of bovine leukemia in recent years in the Republic of Dagestan. *Problemy razvitiya APK regiona*. 2020; 3 (43): 144–149. DOI: 10.15217/issn2079-0996.2020.3.144. (in Russ.)
3. Gillet N., Florin A., Boxus M., Burteau C., Nigro A., Vandermeers F., et al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel antiretroviral therapies in human. *Retrovirology*. 2007; 4:18. DOI: 10.1186/17424690418.
4. Burny A., Cleuter Y., Kettmann R., Mammerickx M., Marbaix G., Portetelle D., et al. Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Cancer Surv*. 1987; 6 (1): 139–159. PMID: 2891439.
5. Meas S., Usui T., Ohashi K., Sugimoto C., Onuma M. Vertical transmission of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency virus in dairy cattle herds. *Vet. Microbiol*. 2002; 84 (3): 275–282. DOI: 10.1016/s0378-1135(01)00458-8.
6. Willems L., Burny A., Dangoisse O., Collete D., Dequiedt F., Gattot J. S., et al. Bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Curr. Top Virol*. 1999; 139–167. Corpus ID: 86336958.
7. Gulyukin M., Barabanov I., Ivanova L., Stepanova T., Kozireva N., Simonian G., et al. Monitoring of epidemiologic situation with Bovine Leukemia in production and breeding herds of Russian Federation in 2014–2015. *Veterinaria i kormlenie*. 2016; 4: 5–41. Available at: <http://vetkorm.ru/magasines/veterinariya-i-kormlenie-4-ijul-avgust-2016g>. (in Russ.)
8. Donnik I. M., Gulyukin M. I., Busol V. A., Kovalenko L. V., Kovalenko A. M. Bovine leukemia virus infection — diagnostics, eradication, and anthropozoonotic potential (background) (review). *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*. 2021; 56 (2): 230–244. DOI: 10.15389/agrobiolog.2021.2.230eng.
9. Mustafayev A. R. Epidemic situation on enzootic bovine leukosis in public and individual farms in the Republic of Dagestan. *Veterinary Science Today*. 2021; (2): 144–150. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-2-37-144-150.
10. Simonyan G. A. Differential diagnostics of hemoblastosis forms. *Veterinariya*. 2013; 9: 21–25. eLIBRARY ID: 20181890. (in Russ.)
11. Simonyan G. A. Gematosarcoma is the neoplastic form of the hemoblastosis. *Veterinariya*. 2014; 5: 21–27. eLIBRARY ID: 21868783. (in Russ.)
12. Simonyan G. A., Khisamudinov F. F. Veterinarnaya gematologiya = Veterinary hematology. Moscow: Kolos; 1995. 256 p. (in Russ.)
13. Pravila veterinarnogo osmotra uboinykh zhivotnykh i veterinarno-sanitarnoi ekspertizy myasa i myasnykh produktov = Rules for ante-mortem examination of slaughter animals and post-mortem inspection of meat and meat products: approved by USSR Minselkhoz 27.12.1983. Available at: <https://legalacts.ru/doc/pravila-veterinarnogo-osmotra-uboinykh-zhivotnykh-i-veterinarno-sanitarnoi>. (in Russ.)
14. Metodicheskie ukazaniya po diagnostike leikoza krupnogo rogatogo skota = Methodical guidance for bovine leukosis diagnosis: approved by Veterinary Department of the RF MoA on 23.08.2000 No. 1372/2130. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200118749>. (in Russ.)
15. Mustafayev A. R. Method of post-mortem diagnosis of bovine leukemia. Patent No. 2744706 Russian Federation, Int. G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/531 (2006.01). Dagestan Agriculture Science Center. No. 2020103451. Date of filing: 27.01.2020. Date of publication: 15.03.2021. Bull. No. 8. (in Russ.)

Поступила в редакцию / Received 08.09.2021

Доработана после рецензирования / Revised 26.10.2021

Принята к публикации / Accepted 03.12.2021

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ / INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Мустафаев Аркиф Рамазанович, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории инфекционной патологии сельскохозяйственных животных, Прикаспийский зональный НИВИ – филиал ФГБНУ «ФАНЦ РД», г. Махачкала, Россия.

Arkiv R. Mustafayev, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Infectious Pathology of Farm Animals, Caspian Regional Research Veterinary Institute – Branch of Dagestan Agriculture Science Center, Makhachkala, Russia.



Сравнительная характеристика кишечного микробиома местного крупного рогатого скота и скота абердин-ангусской породы, импортированного в Казахстан

А. Т. Даугалиева¹, С. Т. Даугалиева², М. А. Кинеев³, Б. С. Арынгазиев⁴, А. И. Сембаева⁵, Т. А. Лаврентьева⁶

^{1,3-6} ТОО «Казахский научно-исследовательский институт животноводства и кормопроизводства» (ТОО «КазНИИЖИК»), г. Алматы, Казахстан

² ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», г. Алматы, Казахстан

¹ <https://orcid.org/0000-0002-7703-7798>, e-mail: aida1979@bk.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-8826-3942>, e-mail: saule.daugaliev@mail.ru

³ <https://orcid.org/0000-0003-2170-6160>, e-mail: K_maratAK@mail.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-0256-4972>, e-mail: berik_aryngaziev@mail.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0003-3392-208X>, e-mail: sembaeva_aigul@mail.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0002-70444-0613>, e-mail: tane4ka_84_25@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Микробиом животных играет существенную роль во всех жизненно важных процессах организма. Его изучение необходимо для детального понимания процессов, происходящих между микроорганизмами, населяющими определенный орган, и их взаимосвязи с клетками макроорганизма. Оценка состояния микробного сообщества животных и его функции может оказать неоценимую помощь в поиске новых стратегий повышения эффективности кормления и сохранения здоровья крупного рогатого скота. Целью исследования было сравнение таксономической структуры микробиома кишечника крупного рогатого скота абердин-ангусской породы, импортированного в Казахстан, и коров местных пород с помощью технологии секвенирования нового поколения. Был определен полный микробный состав содержимого кишечника животных при исследовании образцов экскрементов без предварительной стадии микробиологического культивирования на питательных средах. Результаты 16S метагеномного анализа показали, что доминирующими бактериальными таксонами в микробиоме кишечника животных обеих групп на уровне типа были *Firmicutes* и *Proteobacteria* примерно в одинаковом количестве. На уровне бактериальных семейств численность представителей *Clostridiaceae* была немного больше у коров абердин-ангусской породы (19,7%), чем у скота местной породы (15,4%). Представители семейств *Bacteroidaceae*, *Peptococcaceae*, *Ruminococcaceae* и *Coriobacteriaceae* преобладали в микробном сообществе кишечника местного скота. Данные микроорганизмы участвуют в синтезе витаминов, стимулируют иммунную функцию организма, нормализуют пищеварение, увеличивают усвояемость питательных веществ и, как следствие, повышают привесы у животных. Бактерии семейства *Prevotellaceae* были выявлены в небольшом количестве (0,5%) только у коров местной породы, которые имели высокие привесы. На уровне рода значительное разнообразие наблюдали в микробиоме местного скота: всего 65 таксонов против 40 у абердин-ангусов. Установлено, что в кишечном микробиоме крупного рогатого скота местных пород содержится меньшее количество метаногенов и большее количество ацетогенов.

Ключевые слова: микробиом, крупный рогатый скот, абердин-ангусская порода, секвенирование нового поколения

Благодарности: Работа профинансирована и выполнена в рамках грантового проекта Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан ИРН АР09259133 «Исследование микробиома желудочно-кишечного тракта крупного рогатого скота с целью уменьшения выбросов парниковых газов».

Для цитирования: Даугалиева А. Т., Даугалиева С. Т., Кинеев М. А., Арынгазиев Б. С., Сембаева А. И., Лаврентьева Т. А. Сравнительная характеристика кишечного микробиома местного крупного рогатого скота и скота абердин-ангусской породы, импортированного в Казахстан. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (1): 53–60. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-53-60.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Даугалиева Сауле Тлековна, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник, ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», 050010, Республика Казахстан, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, 105, e-mail: saule.daugaliev@mail.ru.

Comparative analysis of intestinal microbiome of local cattle and Aberdeen Angus cattle imported to Kazakhstan

A. T. Daugaliyeva¹, S. T. Daugaliyeva², M. A. Kineev³, B. S. Aryngaziyev⁴, A. I. Sembaeva⁵, T. A. Lavrentieva⁶

^{1,3-6} Kazakh Research Institute of Livestock and Fodder Production LLP, Almaty, Kazakhstan

² Scientific Production Center of Microbiology and Virology LLP, Almaty, Kazakhstan

¹ <https://orcid.org/0000-0002-7703-7798>, e-mail: aida1979@bk.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-8826-3942>, e-mail: saule.daugaliev@mail.ru

© Даугалиева А. Т., Даугалиева С. Т., Кинеев М. А., Арынгазиев Б. С., Сембаева А. И., Лаврентьева Т. А., 2022

³<https://orcid.org/0000-0003-2170-6160>, e-mail: K_maratAK@mail.ru

⁴<https://orcid.org/0000-0002-0256-4972>, e-mail: berik_aryngaziev@mail.ru

⁵<https://orcid.org/0000-0003-3392-208X>, e-mail: sembaeva_aigul@mail.ru

⁶<https://orcid.org/0000-0002-70444-0613>, e-mail: tane4ka_84_25@mail.ru

SUMMARY

Animal microbiome plays a significant role in all the vital body processes. Studying the microbiome is essential for gaining a detailed insight into the interactions among microorganisms inhabiting a certain organ and their relationship with macroorganism cells. Evaluating the state of animal microbial community and its function can provide an invaluable assistance in seeking new strategies to improve feed efficiency and maintain cattle health. The aim of the study was to compare the taxonomic structure of the intestinal microbiome of Aberdeen Angus cattle imported to Kazakhstan with that of local breed cows using next generation sequencing technology. The tests of fecal samples allowed for determination of the complete microbial composition of animal intestinal contents, while leaving out the preliminary stage of microbiological cultivation using nutrient media. The results of 16S metagenomic analysis showed that *Firmicutes* and *Proteobacteria* were predominant bacterial taxa at the phylum level in the intestinal microbiome in both groups of animals, with their numbers being roughly the same. At the bacterial family level, the number of *Clostridiaceae* was a little higher in Aberdeen Angus cows (19.7%) than in the local breed cattle (15.4%). The representatives of the families *Bacteroidaceae*, *Peptococcaceae*, *Ruminococcaceae* and *Coriobacteriaceae* prevailed in the gut microbial community of local cattle. These microorganisms are involved in the synthesis of vitamins, they stimulate the immune function of the body, normalize digestion, improve nutrient utilization and thus contribute to body weight gain in animals. Small numbers (0.5%) of bacteria of the family *Prevotellaceae* were detected only in the local breed cows demonstrating high body weight gain. The microbiome of the local cattle was characterized by a considerable diversity at the genus level: the total number of taxa amounted to 65, whereas in Aberdeen Angus cattle it was 40. It was found that the intestinal microbiome of local breed cattle includes less methanogens and more acetogens.

Keywords: microbiome, cattle, Aberdeen Angus, next generation sequencing

Acknowledgements: The study was funded and carried out within the framework of the grant project of the Science Committee of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan IRN AR09259133 "Cattle gastrointestinal microbiome studies aimed to reduce greenhouse gas emissions".

For citation: Daugaliyeva A. T., Daugaliyeva S. T., Kineev M. A., Aryngaziyev B. S., Sembaeva A. I., Lavrentieva T. A. Comparative analysis of intestinal microbiome of local cattle and Aberdeen Angus cattle imported to Kazakhstan. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (1): 53–60. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-53-60.

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

For correspondence: Saule T. Daugaliyeva, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Scientific Production Center of Microbiology and Virology LLP, 050010, Republic of Kazakhstan, Almaty, Bogenbai Batyr str., 105, e-mail: saule.daugaliev@mail.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Жвачные животные, включая крупный и мелкий рогатый скот, являются важным источником получения продуктов питания для человека. Абердин-ангусская порода коров (абердин-ангус) считается самой популярной в мире для производства мраморного мяса. При этом говядина обладает изумительным вкусом и необычайной сочностью. Животные данной породы неприхотливы, быстро растут и набирают мясную массу. Всего лишь за одни сутки прирост массы бычков может составлять от 1 до 5 кг. Благодаря скороспелости и высокому качеству мяса данная порода получила широкое распространение, и поэтому в последние годы в Республику Казахстан импортируется большое количество абердин-ангусов. Однако процесс адаптации скота в условиях Казахстана не изучен, в том числе неизвестно, какое влияние на организм и продуктивность животных оказывает местный климат и рацион кормления.

Микробиом является важной составляющей живых организмов, оказывающей влияние на иммунитет, продуктивность и жизнедеятельность животных. Кишечный микробиом коров, включающий в себя бактерии, археи, простейшие и грибы, обеспечивает выработку различных ферментов, необходимых для расщепления растительных волокон на летучие жирные кислоты

и микробный сырой белок. Изучение состава микробного сообщества, участвующего в микробном метаболизме рубца, представляет большой интерес при разработке новых стратегий для повышения эффективности кормления и сохранения здоровья крупного рогатого скота [1]. В состав микробиома также входят метаногенные археи, от которых зависит количество выделяемого животными метана, что является одной из проблем современной экологии.

Большая часть микробов не культивируется *in vitro* и не может быть выращена на лабораторных питательных средах. Процесс выращивания анаэробов довольно сложен из-за медленного роста микробов, необходимости ограничения доступа кислорода и других требований, предъявляемых к параметрам культивирования [2]. Метагеномный анализ позволяет описать микробное сообщество с помощью высокопроизводительной технологии секвенирования нового поколения (NGS) на основе идентификации ДНК, минуя стадию микробиологического культивирования. Секвенирование гипервариабельных областей высококонсервативных и универсальных генов 16S рРНК широко используется для характеристики бактериальных сообществ и архей [3, 4].

Целью работы было сравнение таксономической структуры микробиома кишечника крупного рогатого скота абердин-ангусской породы и местных пород

для оценки его влияния на иммунитет, продуктивность животных, выработку метана в условиях Республики Казахстан.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы фекалий отбирали из прямой кишки в трех повторностях от трех голов крупного рогатого скота абердин-ангусской породы седьмого поколения и трех голов коров местных пород в хозяйствах, расположенных на соседних фермах в Алматинской области. Все образцы кишечного содержимого немедленно замораживали в сухом льду и доставляли в лабораторию, где хранили при минус 80 °С до выделения ДНК.

16S метагеномный анализ проводили на секвенаторе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора для секвенирования MiSeq reagent Kit V3 (300 cycle) (Illumina, США).

Микробную ДНК из фекалий экстрагировали с помощью набора PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit согласно протоколу производителя (Invitrogen, США). Концентрацию ДНК измеряли на флуориметре Qubit® 2.0 (Invitrogen, США).

Генетические библиотеки готовили согласно протоколу 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Part # 15044223 Rev. A, Illumina, США). Варибельные V3 и V4 регионы 16S рРНК гена были амплифицированы с помощью универсальных праймеров с добавлением адаптеров Illumina: прямой праймер – 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGWCAG-3' и обратный праймер – 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3' [5]. Реакционная смесь содержала: 2,5 µL ДНК-матрицы, по 5 µL каждого праймера с концентрацией 1 µM, 12,5 µL 2x КАРА HiFi HotStart ReadyMix (Кара Biosystems, Inc., США). ПЦР-амплификация была проведена в термоциклере Eppendorf Mastercycler pro S (Eppendorf, Германия) по следующей программе: 95 °С – 3 мин; 25 циклов: 95 °С – 30 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 30 с; один цикл при 72 °С – 5 мин.

Концентрацию и размер ПЦР-продукта определяли на Bioanalyzer 2100 (Agilent, США).

Далее к каждому образцу добавляли адаптеры Nextera XT Index primer (Illumina, США) путем амплификации в реакционной смеси: 12,5 µL КАРА HiFi HotStart ReadyMix, по 5 µL каждого индекс-праймера, 10 µL воды и по 5 µL ПЦР-продукта. Программа амплификации: 95 °С – 3 мин; 8 циклов: 95 °С – 30 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 30 с; один цикл при 72 °С – 5 мин.

ПЦР-продукт до и после добавления индексов был очищен с помощью набора Agencourt AMPure PCR purification kit (Beckman Coulter, Inc., США).

Полученные библиотеки были нормализованы до концентрации 4 nM и объединены в общий пул. Библиотеки соединяли с реагентом для контроля секвенирования MiSeq™ PhiX Control Kit (Illumina, США), вносили в картридж набора для секвенирования, затем картридж и проточную ячейку загружали в прибор. Реакцию секвенирования осуществляли с помощью программного обеспечения MiSeq™ Control Software v2.6. Пул библиотек секвенировали в приборе MiSeq (Illumina, США) с помощью набора MiSeq reagent Kit V3 (300 cycle) (Illumina, США).

Анализ и обработка данных были проведены с помощью программного обеспечения MiSeq™ Reporter Software (Illumina, США). Таксономическая классификация осуществлялась путем сравнения с данными 16S рРНК гена из международной базы данных Greengenes Database Lawrence Berkeley National Laboratory (LBNL, США) (<http://greengenes.lbl.gov>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Таксономическую идентификацию всех присутствующих в кишечном микробиоме бактерий проводили по следующим таксономическим рангам: царство, отдел, класс, порядок, семейство, род и вид.

Как показано на рисунке 1а, большинство оперативных таксономических единиц, выявленных в фекалиях

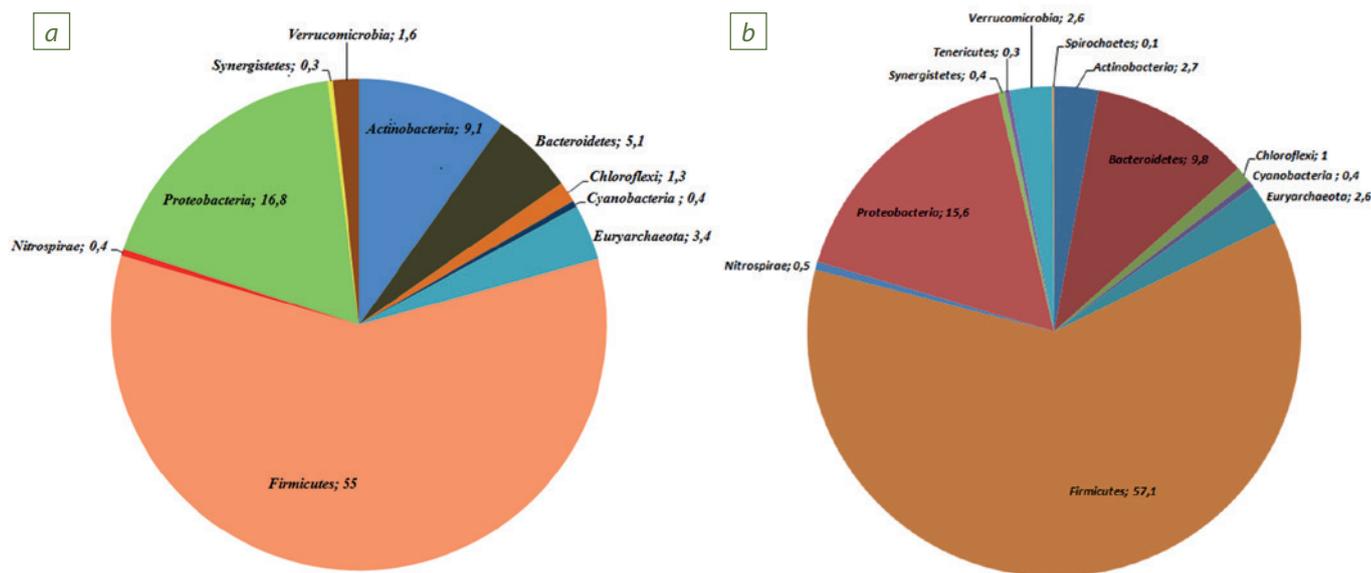


Рис. 1. Относительная численность (% от общего количества) основных типов бактерий, обнаруженных в микробиоме кишечника крупного рогатого скота: а – абердин-ангусская порода и б – местные породы Казахстана

Fig. 1. Relative abundance (% of the total number) of major types of bacteria detected in the intestinal microbiome of cattle: а – Aberdeen Angus and b – local breeds of Kazakhstan

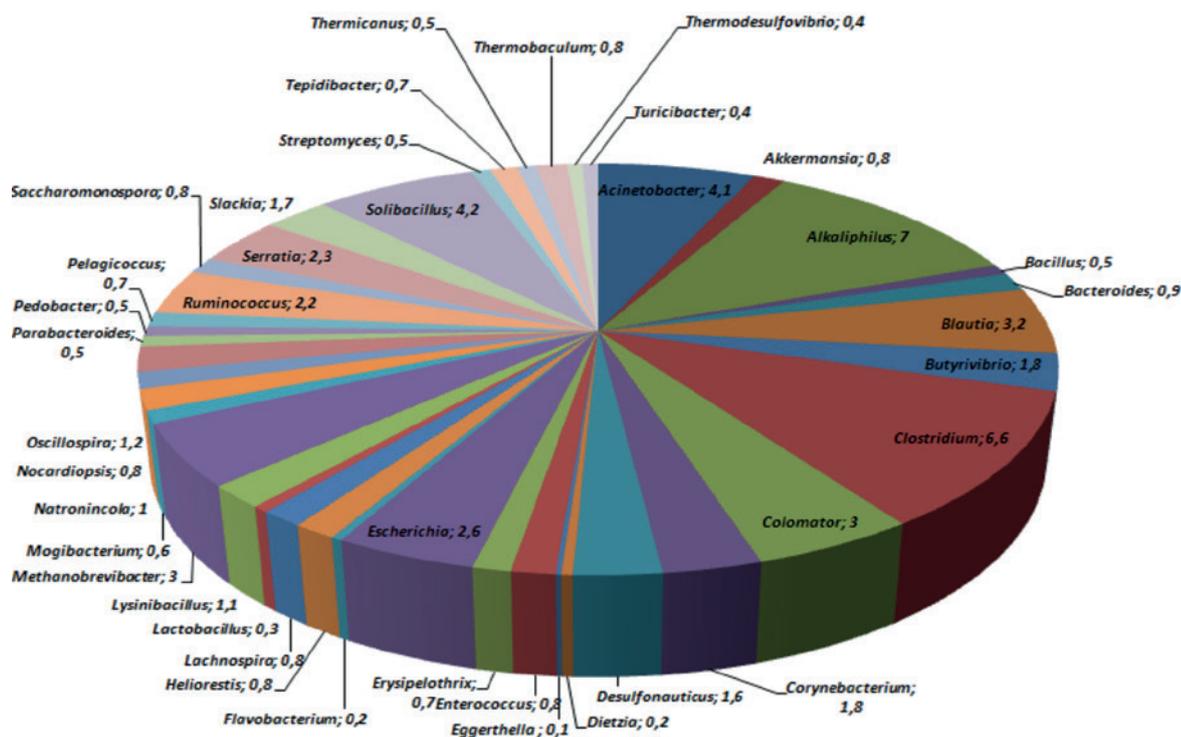


Рис. 3. Микробный профиль бактериального сообщества кишечника на уровне рода у крупного рогатого скота абердин-ангусской породы

Fig. 3. Gut microbial community profile (bacterial genus level) in Aberdeen Angus cattle

культур, тогда как представителей *Bacteroidaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Paraprevotellaceae* значительно чаще выявляют у животных, питающихся травой. Однако полученные в настоящем исследовании результаты не подтвердили данное утверждение. Микроорганизмы семейств *Bacteroidaceae* и *Peptococcaceae*, участвующие в синтезе витаминов, нормализующие процесс пищеварения, стимулирующие иммунную функцию организма и подавляющие патогенные микробы, были обнаружены в большем количестве у местного скота. Считается, что численность *Prevotellaceae* в 10 раз больше у коров, которым скармливают необработанное зерно, чем у животных, получавших исключительно фураж. При проведении метагеномного анализа в рамках данной работы микроорганизмы этого семейства были выявлены в небольшом количестве (0,5%) у скота местных пород.

Ruminococcaceae является наиболее многочисленным семейством микроорганизмов в составе микробиома прямой кишки животных, питающихся травой. Эта группа бактерий использует пищевые волокна в качестве источника энергии. Повышенное количество *Ruminococcaceae* и *Lachnospiraceae* в микробном сообществе кишечника указывает на более полную ферментацию клетчатки, крахмала и увеличение усвояемости питательных веществ. Также представителями этих таксонов являются ацетогены, которые используют водород в качестве источника энергии. Численность данных микроорганизмов увеличивается при уменьшении образования метана, что и наблюдали в опыте у местного крупного рогатого скота. У коров, находящихся на зерновом откорме, бактерии семейства *Ruminococcaceae* преобразуют первичные желчные кислоты во вторичные и тем самым способствуют нормальному пищеварению [15–17].

Высокая численность *Clostridiaceae* наблюдается в тощей кишке у животных, получавших концентрированные корма, и у телят, отнятых от коров-матерей. Большинство представителей *Clostridiaceae* являются комменсалами и участвуют в переваривании углеводов и белков. Некоторые *Clostridiaceae*, такие как *Clostridium perfringens*, являются причиной ряда инфекционных заболеваний человека и животных [16, 17]. Бактерии семейства *Coriobacteriaceae* могут модулировать метаболизм липидов у животного, поэтому их обнаруживают в большом количестве у бычков с высокими привесами [16].

Shabat S. K. et al. установили, что у дойных коров с наименьшей эффективностью использования корма в кишечном микробиоме преобладали микроорганизмы семейства *Lachnospiraceae* [18]. F. Li et al. также наблюдали, что доля бактерий *Lachnospiraceae* увеличивалась у крупного рогатого скота с низкой эффективностью использования корма [19]. Однако эти данные не согласуются с исследованиями P. R. Myer et al., которые доказали, что представители семейства *Lachnospiraceae* более многочисленны в составе микрофлоры бычков с наибольшими привесами [20]. Возрастание численности *Lachnospiraceae* способствует более активному расщеплению пищевых компонентов бактериальными ферментами в слепой кишке, что приводит к повышенному синтезу летучих жирных кислот и увеличению количества питательных веществ. Многие представители *Lachnospiraceae* производят микробный метаболит бутират, который является источником энергии для эпителиальных клеток кишечника [3, 14, 15]. В проведенном исследовании у местного скота было выявлено большее количество *Lachnospiraceae* по сравнению

с абердин-ангусами. Как отмечено P. R. Myer et al., численность микробов семейства *Erysipelotrichaceae* была больше в слепой кишке бычков с наибольшими привесами и наименьшим среднесуточным потреблением корма [20]. Бактерии *Erysipelotrichaceae* участвуют в метаболизме липидов, и сокращение их количества способствует повышению кишечной проницаемости и развитию воспаления [15]. Данные микроорганизмы были выявлены у всех коров абердин-ангусской породы и одного животного местной породы. Семейство *Enterobacteriaceae* включает в себя, наряду с безвредными симбионтами, известные патогены [16]. В нашем исследовании бактерии рода *Serratia* были обнаруже-

ны у абердин-ангусов в 2,3% случаев и у коров местной породы – в 0,9%, бактерии рода *Escherichia* выявлены у всех животных породы абердин-ангус (2,6%) и у одной коровы местной породы (1,2%). Известно, что микроорганизмы *Escherichia* тормозят кишечный транзит и двигательную активность кишечника [21], представители родов *Escherichia* и *Streptococcus* продуцируют токсичные соединения [20]. Как показало исследование, наиболее многочисленным видом микроорганизмов из обнаруженных у всех абердин-ангусов и у двух голов местного скота была *Escherichia albertii*, отличающаяся от *Escherichia coli* наличием дополнительного *eae* гена [22]. *Escherichia coli* выявили только у одной головы местного скота (0,3%). При исследовании проб фекалий местного скота у одного животного был выявлен геном бактерий *Clostridiaceae* (1,3%). Доля кишечной палочки существенно увеличивается при воспалительных процессах в кишечнике, что приводит к дисбактериозу. У коров, в структуре рациона которых преобладает зерно, наблюдали увеличение числа популяций патогенных *Escherichia coli* и *Clostridium perfringens* в рубце и задней кишке [7].

Родовой профиль бактерий, выявленных у коров абердин-ангусской и местной пород, отображен на рисунках 3 и 4.

Как показано на рисунке 3, роды бактерий *Alkaliphilus* (7,0%), *Clostridium* (6,6%), *Acinetobacter* (4,1%), *Solibacillus* (4,2%), *Blautia* (3,2%), *Colomator* и *Methanobrevibacter* (3,0%), *Serratia* (2,3%), *Ruminococcus* (2,2%), *Escherichia* (2,6%) были основными таксонами микробиома прямой кишки у крупного рогатого скота абердин-ангусской породы. У крупного рогатого скота местных пород преобладали роды бактерий *Clostridium* (7,5%), *Acinetobacter* (7,0%), *Blautia* (3,7%), *Solibacillus* (2,7%), *Alkaliphilus* и *Colomator* (2,6%), *Ruminococcus* и *Oscillospira* (2,5%), *Escherichia* (1,2%) (рис. 4).

Метан, образуемый населяющими рубец крупного рогатого скота метаногенными бактериями, является одним из источников загрязнения атмосферы [23]. Род бактерий *Methanobrevibacter* был обнаружен у всех коров абердин-ангусской породы и у двух голов местного скота, род *Methanosphaera* выявлен только у одной коровы местной породы.

Представители рода *Lactobacillus* были обнаружены только у двух животных абердин-ангусской породы. Лактобациллы продуцируют молочную кислоту (лактат) в качестве основного конечного продукта углеводного метаболизма и участвуют в биотрансформации желчных кислот. При проведении настоящего исследования бактерии родов *Lactobacillus*, *Streptococcus* и *Sharpea* были выявлены у одной коровы местной породы, *Selenomonas* обнаружен у двух голов местного скота. Микроорганизмы рода *Ruminococcus* участвуют в разложении полисахаридов [15, 17]. Как показывают литературные данные, численность *Ruminococcus* бывает значительно больше у животных, получающих зерно, тогда как *Solibacillus* и *Acinetobacter* чаще выявляют у коров, которым скармливают траву [3, 16], что согласуется с результатами наших экспериментов.

Известно, что микроорганизмы родов *Streptococcus* и *Bifidobacterium* преобладают в микробном сообществе кишечника крупного рогатого скота, получавшего рацион с высокой долей зерна и при ацидозе рубца. Данные бактерии производят молочную кислоту в ре-

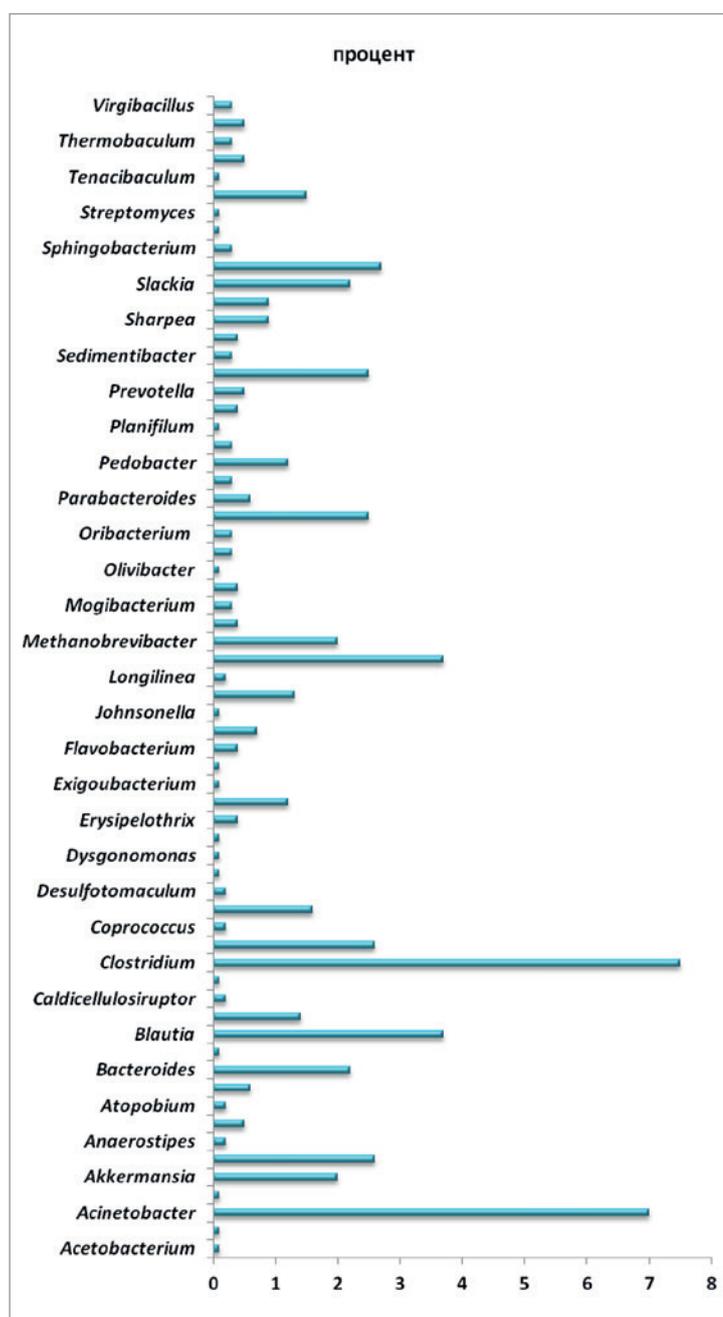


Рис. 4. Микробный профиль бактериального сообщества кишечника на уровне рода у крупного рогатого скота местных пород

Fig. 4. Gut microbial community profile (bacterial genus level) in local breed cattle

зультате ферментации крахмала в рубце [14, 16]. *Bifidobacterium* также обладает антимикробной активностью, производят ацетат [14, 15]. В нашем исследовании только у одной коровы местной породы присутствовали представители данных родов.

Микроорганизмы родов *Butyrivibrio* и *Blautia* часто встречаются у бычков при эффективном откорме [11]. Бактерии *Butyrivibrio* разлагают пектин, фенилаланин, тирозин и триптофан [12, 15]. Общей чертой бактерий рода *Blautia* является утилизация водорода и диоксида углерода и способность продуцировать ацетат (уксусную кислоту) во время расщепления сложных углеводов. Бактерии рода *Akkermansia* производят жирные кислоты, такие как ацетат, пропионат и бутират. Численность аккермансий снижается на фоне воспалительных заболеваний кишечника [15, 20]. Бактерии рода *Lysinibacillus* в процессе метаболизма различных сахаров и простых углеводов используют кислород. *Alcaliphilus peptidifermentans* – микроорганизм, ферментирующий пептиды и способный восстанавливать Fe (III) [24], был выявлен у трех абердин-ангусов и двух голов местного скота.

У животных, получавших концентрированные корма, представители бактериального рода *Prevotella* являются основными продуцентами пропионата и сукцината [7]. *Prevotella* расщепляет полисахариды и белки, присутствует в рубце и способна эффективно расти в кислой среде при pH 5,1 [12, 14]. Численность данных бактерий увеличивается при ингибировании метаногенеза. Кроме того, превотелла способна разлагать пектин и является поставщиком метанола в рубце [12, 23]. Бактерии этого рода были выявлены только у двух коров местной породы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в исследованиях была определена таксономическая структура и проведена сравнительная характеристика бактериального микробиома кишечника импортных и местных пород крупного рогатого скота.

Преобладание бактериального типа *Euryarchaeota* у абердин-ангусов в сравнении с местным скотом свидетельствует о повышенном образовании метана. Так, метаногенные бактерии родов *Methanobrevibacter* и *Methanosphaera* чаще выявляли у скота абердин-ангусской породы. Бактериальные семейства *Lachnospiraceae* и *Blautia* преобладали в кишечном микробиоме местного скота, что показывает его преимущество над абердин-ангусами, так как данные семейства являются ацетогенами. Микроорганизмы семейства *Prevotellaceae*, также являющиеся ацетогенами, обнаружены только у местного скота.

Условно-патогенные микроорганизмы рода *Serratia* были выявлены у всех исследуемых импортных коров. У одного животного местной породы обнаружили *Escherichia coli* и бактерии рода *Serratia*, еще у одной коровы выявили *Clostridium perfringens*.

Представители семейств *Bacteroidaceae* и *Peptococcaceae* преобладали в микробном сообществе кишечника местного скота. Бактерии семейства *Prevotellaceae* были выявлены только у коров местной породы, которые имели высокие привесы. Представители семейств *Ruminococcaceae* и *Coriobacteriaceae* преобладали у местного скота. Данные микроорганизмы нормализуют пищеварение, увеличивают усвояемость питательных веществ и, как следствие, повышают привесы у живот-

ных. Бактерии рода *Bifidobacterium* были обнаружены у одной головы местного крупного рогатого скота.

Таким образом, результаты исследования показали, что в кишечном микробиоме крупного рогатого скота местных пород в меньшем количестве содержатся метаногены и широко представлены ацетогены, а также выявлен ряд патогенов, что, видимо, связано с пастбищным содержанием.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Carberry C. A., Kenny D. A., Han S., McCabe M. S., Waters S. M. Effect of phenotypic residual feed intake and dietary forage content on the rumen microbial community of beef cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78 (14): 4949–4958. DOI: 10.1128/AEM.07759-11.
2. Rufener W. H. Jr., Nelson W. O., Wolin M. J. Maintenance of the rumen microbial population in continuous culture. *Appl. Microbiol.* 1963; 11 (3): 196–201. DOI: 10.1128/am.11.3.196-201.1963.
3. Matthews C., Crispie F., Lewis E., Reid M., O'Toole P. W., Cotter P. D. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. *Appl. Microbes.* 2019; 10 (2): 115–132. DOI: 10.1080/19490976.2018.1505176.
4. Pace N. R., Stahl D. A., Lane D. J., Olsen G. J. The Analysis of Natural Microbial Populations by Ribosomal RNA Sequences. In: *Advances in Microbial Ecology*. Eds. K. C. Marshall. Vol. 9. Boston: Springer; 1986; Chapter 1: 1–55. DOI: 10.1007/978-1-4757-0611-6_1.
5. Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., Glöckner F. O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41 (1):e1. DOI: 10.1093/nar/gks808.
6. Mao S. Y., Zhang R. Y., Wang D. S., Zhu W. Y. Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation on rumen microbiota in dairy cattle using pyrosequencing. *Anaerobe.* 2013; 24: 12–19. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2013.08.003.
7. Li R. W., Connor E. E., Li C., Baldwin VI R. L., Sparks M. E. Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools. *Environ. Microbiol.* 2012; 14 (1): 129–139. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02543.x.
8. Khafipour E., Li S., Tun H. M., Derakhshani H., Moossavi S., Plaizier J. C. Effects of grain feeding on microbiota in the digestive tract of cattle. *Animal Frontiers.* 2016; 6 (2): 13–19. DOI: 10.2527/af.2016-0018.
9. Shanks O. C., Kelty C. A., Archibeque S., Jenkins M., Newton R. J., McLellan S. L., et al. Community structures of fecal bacteria in cattle from different animal feeding operations. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77 (9): 2992–3001. DOI: 10.1128/AEM.02988-10.
10. Plaizier J. C., Li S., Tun H. M., Khafipour E. Nutritional models of experimentally-induced subacute ruminal acidosis (SARA) differ in their impact on rumen and hindgut bacterial communities in dairy cows. *Front. Microbiol.* 2017; 7:2128. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02128.
11. Myer P. R. Bovine genome-microbiome interactions: metagenomic frontier for the selection of efficient productivity in cattle systems. *mSystems.* 2019; 4 (3):e00103-19. DOI: 10.1128/mSystems.00103-19.
12. Kim M., Park T., Yu Z. Metagenomic investigation of gastrointestinal microbiome in cattle. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 2017; 30 (11): 1515–1528. DOI: 10.5713/ajas.17.0544.
13. Kelly W. J., Leahy S. C., Kamke J., Soni P., Koike S., Mackie R., et al. Occurrence and expression of genes encoding methyl-compound production in rumen bacteria. *Anim. Microbiome.* 2019; 1 (1):15. DOI: 10.1186/s42523-019-0016-0.
14. Wallace R. J., Sasson G., Garnsworthy P. C., Tapio I., Gregson E., Bani P., et al. A heritable subset of the core rumen microbiome dictates dairy cow productivity and emissions. *Sci. Adv.* 2019; 5 (7):eaav8391. DOI: 10.1126/sciadv.aav8391.
15. Bach A., López-García A., González-Recio O., Elcoso G., Fàbregas F., Chaucheyras-Durand F., Castex M. Changes in the rumen and colon microbiota and effects of live yeast dietary supplementation during the transition from the dry period to lactation of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2019; 102 (7): 6180–6198. DOI: 10.3168/jds.2018-16105.
16. Freetly H. C., Dickey A., Lindholm-Perry A. K., Thallman R. M., Keele J. W., Foote A. P., Wells J. E. Digestive tract microbiota of beef cattle that differed in feed efficiency. *J. Anim. Sci.* 2020; 98 (2):skaa008. DOI: 10.1093/jas/skaa008.
17. Liu J., Liu F., Cai W., Jia C., Bai Y., He Y., et al. Diet-induced changes in bacterial communities in the jejunum and their associations with bile acids in Angus beef cattle. *Anim. Microbiome.* 2020; 2 (1):33. DOI: 10.1186/s42523-020-00051-7.
18. Shabat S. K., Sasson G., Doron-Faigenboim A., Durman T., Yaacoby S., Berg Miller M. E., et al. Specific microbiome-dependent mechanisms

underlie the energy harvest efficiency of ruminants. *ISME J.* 2016; 10 (12): 2958–2972. DOI: 10.1038/ismej.2016.62.

19. Li F., Guan L. L. Metatranscriptomic profiling reveals linkages between the active rumen microbiome and feed efficiency in beef cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 2017; 83 (9):e00061-17. DOI: 10.1128/AEM.00061-17.

20. Myer P. R., Smith T. P., Wells J. E., Kuehn L. A., Freetly H. C. Rumen microbiome from steers differing in feed efficiency. *PLoS One.* 2015; 10 (6):e0129174. DOI: 10.1371/journal.pone.0129174.

21. Zhang G., Wang Y., Luo H., Qiu W., Zhang H., Hu L., et al. The association between inflammaging and age-related changes in the ruminal and fecal microbiota among lactating Holstein cows. *Front. Microbiol.* 2019; 10:1803. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01803.

22. Лычкова А. Э. Взаимодействие электромоторной активности гладких мышц и микрофлоры кишечника. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2012; 11: 84–90. eLIBRARY ID: 21589953.

Lychkova A. E. Interaction of myoelectrical activity of the intestinal smooth muscles and microflora. *Experimental and Clinical Gastroenterology.* 2012; 11: 84–90. eLIBRARY ID: 21589953.

23. Martinez-Fernandez G., Denman S. E., Yang C., Cheung J., Mitsumori M., McSweeney C. S. Methane inhibition alters the microbial community, hydrogen flow, and fermentation response in the rumen of cattle. *Front. Microbiol.* 2016; 7:1122. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01122.

24. Khafipour E., Li S., Plaizier J. C., Krause D. O. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75 (22): 7115–7124. DOI: 10.1128/AEM.00739-09.

Поступила в редакцию / Received 09.06.2021

Поступила после рецензирования / Revised 23.07.2021

Принята к публикации / Accepted 10.08.2021

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Даугалиева Аида Тлековна, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник ТОО «Казахский научно-исследовательский институт животноводства и кормопроизводства», г. Алматы, Республика Казахстан.

Даугалиева Сауле Тлековна, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», г. Алматы, Республика Казахстан.

Кинеев Марат Айдарович, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, академик НАН Казахстана, главный научный сотрудник ТОО «Казахский научно-исследовательский институт животноводства и кормопроизводства», г. Алматы, Республика Казахстан.

Арынгазиев Берик Серикович, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник ТОО «Казахский научно-исследовательский институт животноводства и кормопроизводства», г. Алматы, Республика Казахстан.

Сембаева Айгуль Ибрагимовна, магистр, младший научный сотрудник ТОО «Казахский научно-исследовательский институт животноводства и кормопроизводства», г. Алматы, Республика Казахстан.

Лаврентьева Татьяна Александровна, бакалавр, младший научный сотрудник ТОО «Казахский научно-исследовательский институт животноводства и кормопроизводства», г. Алматы, Республика Казахстан.

Aida T. Daugaliyeva, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Kazakh Research Institute of Livestock and Fodder Production LLP, Almaty, Republic of Kazakhstan.

Saule T. Daugaliyeva, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Scientific Production Center of Microbiology and Virology LLP, Almaty, Republic of Kazakhstan.

Marat A. Kineev, Doctor of Agricultural Science, Professor, Academician of the NAS of the Republic of Kazakhstan, Chief Researcher, Kazakh Research Institute of Livestock and Fodder Production LLP, Almaty, Republic of Kazakhstan.

Berik S. Aringazyev, Candidate of Agricultural Science, Senior Researcher, Kazakh Research Institute of Livestock and Fodder Production LLP, Almaty, Republic of Kazakhstan.

Aigul I. Sembaeva, Master, Researcher, Kazakh Research Institute of Livestock and Fodder Production LLP, Almaty, Republic of Kazakhstan.

Tatyana A. Lavrentieva, Bachelor, Researcher, Kazakh Research Institute of Livestock and Fodder Production LLP, Almaty, Republic of Kazakhstan.



Эпизоотическая ситуация по оспе овец и оспе коз в Таджикистане в 2000–2021 гг.

Р. А. Атовуллозода

Институт ветеринарной медицины Таджикской академии сельскохозяйственных наук (ИВМ ТАСХН), г. Душанбе, Республика Таджикистан;
<https://orcid.org/0000-0002-0586-8701>, e-mail: rajabmurod69@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Выполненное в 2016 г. моделирование потенциальных нозоареалов оспы овец и оспы коз до 2020 г. выявило возможность тренда на усугубление напряженности эпизоотической обстановки по этим болезням, но с учетом циклических колебаний ситуации допускалась возможность снижения напряженности в 2017–2020 гг. Наибольшая частота регистрации этих нозоединиц была характерна для регионов более высокой вероятности возникновения оспы овец и оспы коз. При ретроспективном анализе определены структура, динамика и особенности эпизоотического процесса данных инфекционных болезней в Республике Таджикистан в 2000–2021 гг. Выявлены основные причины возникновения вспышек оспы овец и оспы коз в стране. Полученные результаты, подтверждающие методическую обоснованность осуществленного в 2016 г. анализа эпизоотической ситуации и верность разработанных моделей потенциальных нозоареалов оспы овец и оспы коз, могут стать основой для эпизоотологического прогнозирования риска возникновения инфекционных болезней при взаимодействии патогена с популяцией восприимчивых животных в конкретных климатогеографических, социально-экономических и организационно-хозяйственных условиях. При системном эпизоотологическом анализе структуры и динамики нозоареалов, результатов оценки риска заноса, возникновения и распространения, мониторинга и определения неблагополучных и эндемичных по оспе овец и оспе коз зон определены особенности и закономерности распространения и проявления эпизоотического процесса при этих заболеваниях, что подтверждает необходимость системного подхода к эпизоотологическому надзору за особо опасными и экономически значимыми инфекционными болезнями, имеющими тенденцию к трансграничному распространению, который будет способствовать решению проблемы определения возможных угроз и реализации ветеринарно-санитарных мероприятий в случае возникновения заболеваний на территории любой страны для сохранения эпизоотологического благополучия.

Ключевые слова: эпизоотическая обстановка, оспа овец, оспа коз, показатели напряженности эпизоотической ситуации, моделирование потенциального нозоареала

Благодарности: Работа выполнена за счет средств Института ветеринарной медицины Таджикской академии сельскохозяйственных наук в рамках тематики научно-исследовательских работ «Дифференциальная диагностика и совершенствование профилактических мероприятий при инфекционных болезнях животных».

Для цитирования: Атовуллозода Р. А. Эпизоотическая ситуация по оспе овец и оспе коз в Таджикистане в 2000–2021 гг. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (1): 61–69. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-61-69.

Конфликт интересов: Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Атовуллозода Раджабмурод Атовулло, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусологии ИВМ ТАСХН, 734005, Республика Таджикистан, г. Душанбе, ул. А. Кахорова, 43, e-mail: rajabmurod69@mail.ru.

Epizootic situation on sheep pox and goat pox in Tajikistan in 2000–2021

R. Atovullozoda

Institute of Veterinary Medicine of the Tajik Academy of Agricultural Sciences, Dushanbe, Republic of Tajikistan;
<https://orcid.org/0000-0002-0586-8701>, e-mail: rajabmurod69@mail.ru

SUMMARY

Modeling of potential nosoareals of sheep pox and goat pox that was performed in 2016 revealed a possible trend for aggravation of epizootic situation intensity with regard to these diseases up to 2020, but taking into account the cyclical fluctuations of the situation, it was assumed that the intensity level might reduce in 2017–2020. The highest frequency of reporting these nosounits was characteristic of regions with a higher probability of sheep pox and goat pox occurrence. The retrospective analysis was used to determine the structure, dynamics and properties of the epizootic process of these infectious diseases in the Republic of Tajikistan in 2000–2021. The main causes of sheep pox and goat pox outbreaks in the country were identified. The obtained results confirming the methodological validity of the epizootic situation analysis carried out in 2016 and correctness of the developed models of potential sheep pox and goat pox nosoareals, can become the basis for epizootological prediction of infectious disease risk when the pathogen interacts with susceptible animal population in specific climatic, socio-economic, organizational and managerial conditions. Based on systemic epidemiological analysis of the structure and dynamics of nosoareals, as well

as risk assessment of sheep pox and goat pox entry, emergence and distribution, monitoring and establishment of infected and endemic zones, the features and patterns of distribution and occurrence of these diseases' epizootic process were defined, which confirms the need for a systematic approach to epidemiological surveillance of highly dangerous and economically significant infectious diseases having a trend for transboundary spread, which will facilitate the solution of the problem regarding identification of possible threats and the implementation of veterinary and sanitary measures in case of disease occurrence in the territory of any country to ensure animal disease freedom.

Keywords: epizootic situation, sheep pox, goat pox, indicators of epizootic situation intensity, modeling of potential nosoarea

Acknowledgements: The work was funded by the Institute of Veterinary Medicine of the Tajik Academy of Agricultural Sciences within the research work "Differential diagnosis and improvement of preventive measures for animal infectious diseases".

For citation: Atovullozoda R. Epizootic situation on sheep pox and goat pox in Tajikistan in 2000–2021. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (1): 61–69. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-61-69.

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

For correspondence: Rajabmurod Atovullozoda, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Virology, Institute of Veterinary Medicine of the Tajik Academy of Agricultural Sciences, 734005, Republic of Tajikistan, Dushanbe, A. Kakhorov str., 43, e-mail: rajabmurod69@mail.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Сложная эпизоотическая обстановка в мире по ряду особо опасных болезней мелкого рогатого скота (МРС) вирусной этиологии, в том числе по оспе овец (ОО) и оспе коз (ОК), обуславливает актуальность проведения эпизоотологического мониторинга для оценки риска заноса, возникновения и распространения этих инфекций, наносящих овце- и козоводству значительный экономический ущерб в результате гибели животных и снижения их продуктивности, затрат на проведение ветеринарно-санитарных и охранно-карантинных мероприятий.

Для определения структуры, динамики и особенностей эпизоотического процесса при ОО и ОК в Таджикистане в 2000–2021 гг. осуществлен ретроспективный анализ с учетом результатов, полученных А. В. Книзе и соавт. при моделировании потенциальных нозоареалов этих заболеваний до 2020 г. [1]. Разработка эффективных противоэпизоотических мероприятий основывается на эпизоотологическом прогнозировании, целью которого является установление риска возникновения инфекционной болезни при взаимодействии патогена с популяцией восприимчивых животных в конкретных природных, социально-экономических и организационно-хозяйственных условиях [2, 3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в соответствии с «Методическими рекомендациями по ведению эпизоотологического мониторинга экзотических, особо опасных и малоизвестных болезней» [4] и положениями Кодекса здоровья наземных животных МЭБ [5].

При анализе использовали данные, размещенные на сайтах Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ, <http://www.oie.int>), Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (ФАО, <http://www.fao.org>), Россельхознадзора (<https://fsvps.gov.ru>), отчетов Службы государственного ветеринарного надзора Минсельхоза РТ, Комитета продовольственной безопасности при Правительстве РТ и его структурных подразделений (Национального центра диагностики

продовольственной безопасности (НЦДПБ) и Республиканского противоэпизоотического центра).

Эпизоотологический метод мониторинга ОО и ОК включал: а) сравнительно-описательные приемы и способы; б) аналитические приемы формулирования и статистической проверки гипотез, многомерного статистического анализа и моделирования, натуральных и вычислительных экспериментов; в) приемы синтеза и классификации полученных знаний о закономерностях развития эпизоотической ситуации, причин и условий возникновения заразных заболеваний, обоснования методов и средств контроля эпизоотической обстановки [4].

Для формирования выборок, характеризующих регистрацию и вспышки ОО и ОК в 2000–2021 гг., были рассчитаны показатели напряженности эпизоотической ситуации: индекс стационарности (ИС – отношение числа лет регистрации болезни в стране к числу лет наблюдения, измеряется в долях единицы от 0 до 1,0) и индекс инцидентности (ИИ – частота регистрации новых вспышек в поголовье животных в неблагополучной стране в течение года). Уровень вероятности возникновения и индекс стационарности ОО и ОК оценивали в долях относительно единицы: 0–0,2 – низкий; 0,2–0,4 – ниже среднего; 0,4–0,6 – средний; 0,6–0,8 – выше среднего; 0,8–1,0 – высокий [4, 6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В 1949 г. в Таджикистане впервые официально была зарегистрирована оспа МРС, которую изучали Т. Я. Ванновский [7], В. Н. Лихачев и соавт. [8], У. Г. Кадиров и Ю. Ф. Борисович [9], И. Т. Сатторов и соавт. [10] и др. [11, 12]. Более 100 неблагополучных пунктов по оспе МРС были выявлены в 1951–1952 гг. в Ленинабадской (ныне Согдийской), Кулябской (ныне Хатлонской) областях и районах республиканского подчинения (РРП), причем наиболее тяжело болели (80–90%) козы, из которых погибали 18–28% особей [10].

За 35 лет исследований – с 1961 по 2000 г., исключая 1971–1972, 1987–1988 и 1991 гг., по которым данные отсутствуют, – продолжительность неблагополучия Тад-

жикистана по ОО составила 22 года (выявлено 66 очагов при ИС 0,63 – выше среднего; среднее количество очагов за периоды регистрации болезни (СКОПРБ) – 3; среднее количество очагов за периоды наблюдения (СКОПН) – 1,89). Соответствующие показатели в других центральноазиатских республиках были следующими: Казахстан – 25 лет (186 очагов, ИС 0,71 – выше среднего; СКОПРБ – 7,44; СКОПН – 5,31), Киргизия – 19 лет (129 очагов, ИС 0,54 – средний; СКОПРБ – 6,79; СКОПН – 3,69), Туркменистан – 14 лет (35 очагов, ИС 0,4 – средний; СКОПРБ – 2,5; СКОПН – 1) и Узбекистан – 10 лет (45 очагов, ИС 0,29 – ниже среднего; СКОПРБ – 4,5; СКОПН – 1,29). В Западной Азии также происходили вспышки ОО, которые в Азербайджане регистрировались в течение 15 лет (45 очагов, ИС 0,43 – средний; СКОПРБ – 3; СКОПН – 1,29), Армении – 10 лет (64 очага, ИС 0,29 – ниже среднего; СКОПРБ – 6,4; СКОПН – 1,83). За этот период на Украине были выявлены 3 очага (3 года неблагополучия) при ИС 0,09 – низкий; СКОПРБ – 1; СКОПН – 0,09, а в России период неблагополучия составил 16 лет, когда были зарегистрированы 142 очага (ИС 0,46 – средний; СКОПРБ – 8,88; СКОПН – 4,06). С 1961 по 2000 г. в странах СНГ (Казахстане, Киргизии, Таджикистане, Туркменистане, Узбекистане, России и на Украине) ОО выявляли в течение 34 лет (ИС 0,97; СКОПРБ – 21,03; СКОПН – 20,43), когда были зарегистрированы 715 очагов (табл. 1). Следует отметить, что Киргизия и Узбекистан граничат с Республикой Таджикистан (РТ) и являются ее торговыми партнерами, к которым также относятся Казахстан, Туркменистан, Украина и Россия, причем Казахстан, Киргизия, Таджикистан и Россия стационарно неблагополучны по ОО и ОК, что определяет остроту проблемы.

Наибольшее количество очагов ОО в РТ наблюдали в 1964 и 1965 гг. (по 9), наименьшее – в 1967, 1978, 1983, 1986, 1993 и 1998 гг. (по 1), а в 1970, 1973, 1977,

1980–1982, 1984, 1985, 1989, 1990, 1994, 1997 и 1999 гг. заболевание не регистрировали.

По данным МЭБ [5], в 1992, 1993, 1996–1998, 2000–2003, 2005–2010 гг. оспу МРС выявляли во всех регионах (Горно-Бадахшанской автономной, Согдийской и Хатлонской областях, РРП) Таджикистана.

Сообщалось [10], что с 1961 по 2000 г. в РТ регистрировали только ОО, и, хотя данные о заболеваемости и смертности отсутствуют, предполагают, что в среднем на один очаг болезни приходилось около 160 заболевших животных, а цикличность эпизоотий в многолетней динамике составляла 5 и 8 лет. Существует также мнение [13], что и в Таджикистане (1992–1998 гг.), и в других странах СНГ: Киргизии (1994–1997 гг.), Азербайджане (1995 г.), Туркменистане (1995 г.), Узбекистане (1995 г.), Казахстане (1995–1997 гг.) – происходили вспышки как ОО, так и ОК.

Учитывая риск заноса, возникновения и распространения ОО и ОК, в приграничных с Афганистаном (Ш. Шохин, М. С. А. Хамадони, Пархарский, Пянджский, Джайхун, Шаартузский, Кубодиенский, Носири-Хусравский) и сопредельных с ними (Муминабадский, Восейский, Дангаринский, Вахшский, Дж. Балхи, Кушониенский, Хуросонский) районах, а также в г. Кулябе Хатлонской области с 2003 г. проводится мониторинг заболеваемости и эффективности вакцинопрофилактики (с 2011 г. – на всей территории РТ). Эпизоотическую угрозу заноса, возникновения и распространения ОО и ОК во всех регионах страны создает совместный выпас на расположенных в этих районах пастбищах для отар, принадлежащих различным хозяйствам. Следует отметить, что в Хатлонской области протекают 5 долинных рек, в том числе Кафирниган и Вахш, формирующие Амударью, которая, как и верхний исток реки Пяндж, является пограничной со стационарно неблагополучным по ОО и ОК Афганистаном, что обуславливает

Таблица 1
Показатели эпизоотической ситуации по оспе овец в странах СНГ в 1961–2000 гг.

Table 1
Data on sheep pox epizootic situation in CIS countries in 1961–2000

Часть света	Субрегион	Страна	Всего		ИС	СКОПРБ	СКОПН
			очагов	лет неблагополучия			
Азия	Западная Азия	Азербайджан	45	15	0,429	3,000	1,286
		Армения	64	10	0,286	6,400	1,829
	Центральная Азия	Казахстан	186	25	0,714	7,440	5,314
		Киргизия	129	19	0,543	6,789	3,686
		Таджикистан	66	22	0,629	3,000	1,886
		Туркменистан	35	14	0,400	2,500	1,000
		Узбекистан	45	10	0,286	4,500	1,286
Европа	Восточная Европа	Украина	3	3	0,086	1,000	0,086
		Россия	142	16	0,457	8,875	4,057
		Всего	715	34			
		Средний			0,971	21,030	20,430

возможность субрегионального риска заноса, возникновения и распространения этих заболеваний.

В эпизоотологическом прогнозе для Российской Федерации и сопредельных государств на период с 2016 по 2020 г. наиболее высокая вероятность возникновения ОО и ОК была определена для Северо-Кавказского, Южного и Крымского округов, причем наибольшая опасность заноса этих болезней исходила из таких стран, граничащих с Россией или имеющих с ней тесные экономические связи, как Таджикистан, Киргизия, Казахстан, Узбекистан, Туркменистан, Армения, Грузия, Азербайджан, Монголия и Китай. Поэтому эпизоотическая обстановка по этим заболеваниям должна постоянно отслеживаться, подвергаться контролю, корректироваться и экстраполироваться на конкретные периоды упреждения [14].

В потенциально неблагополучных регионах до 2020 г. динамически прогнозировался тренд на усугубление напряженности эпизоотической ситуации по ОО и ОК, однако, учитывая циклические колебания обстановки, допускалась возможность снижения напряженности в 2017–2020 гг. Максимальная частота регистрации этих нозоединиц была характерна для регионов более высокой вероятности возникновения ОО и ОК [1].

За анализируемый период (2000–2021 гг. – 22 года) в РТ выявлено 114 очагов ОО (65) и ОК (49): 14 – в Согдийской области (только ОО), 70 – в Хатлонской области (ОО – 44, ОК – 26) и 30 – в РРП (ОО – 7, ОК – 23) (табл. 2). Наибольшее количество очагов (35) в республике зарегистрировано в 2002 г. (ОО – 7, ОК – 28): в Согдийской области соответствующий показатель составил 4 (2008 г.: ОО), в Хатлонской области – 27 (2002 г.: ОО – 7, ОК – 20) и в РРП – 8 (2002 г.: ОК) (рис. 1).

Если в Согдийской области были выявлены только очаги ОО, то в Хатлонской их количество превышало соответствующий показатель для ОК, а в РРП последняя регистрировалась значительно чаще, чем ОО. Большинство очагов ОО выявлены в Хатлонской области (67,69%), за которой следуют Согдийская область (21,54%) и РРП (10,77%), а для ОК соответствующие показатели в Хатлонской области и РРП составили 53,06 и 46,94%. Распределение очагов обоих заболеваний было следующим: Согдийская область (только ОО) – 12,28%, Хатлонская область – 61,4%, РРП – 26,32%. В целом по Таджикистану 57,02% очагов приходилось на ОО и 42,98% – на ОК (рис. 2).

Оспу овец в Согдийской области регистрировали в течение 9 лет (ИС 0,41 – средний; СКОПРБ – 1,56; СКОПН – 0,64), в Хатлонской области – 13 лет (ИС 0,59 – средний; СКОПРБ – 3,38; СКОПН – 2) и в РРП – 5 лет (ИС 0,23 – ниже среднего; СКОПРБ – 1,4; СКОПН – 0,23), а ОК в Хатлонской области выявляли в течение 5 лет (ИС 0,23 – ниже среднего; СКОПРБ – 5,2; СКОПН – 1,18) и в РРП – 9 лет (ИС 0,41 – средний; СКОПРБ – 2,56; СКОПН – 1,05) (рис. 3). Период неблагополучия по этим заболеваниям в РТ с 2000 по 2021 г. составил соответственно 14 лет (ИС 0,64 – выше среднего; СКОПРБ – 4,64; СКОПН – 2,95) и 12 лет (ИС 0,55 – средний; СКОПРБ – 4,08; СКОПН – 2,23), вместе по ОО и ОК – 16 лет (ИС 0,73 – выше среднего; СКОПРБ – 7,13; СКОПН – 5,18). В Хатлонской области из 22 лет наблюдения неблагополучными по обоим болезням были 14 лет (ИС 0,64 – выше среднего; СКОПРБ – 5; СКОПН – 3,18) и в РРП – 11 лет (ИС 0,5 – средний; СКОПРБ – 2,73; СКОПН – 1,36).

За изученный период пики заболеваемости ОО в РТ (рис. 4) регистрировали в 2002 г. (7 очагов в Хатлонской области), 2008 г. (10 очагов: 4 – в Согдийской и 6 – в Хатлонской областях) и 2013 г. (5 очагов: по 1 – в Согдийской и Хатлонской областях, 3 – в РРП). Однако пики выявления очагов болезни в регионах не во всех случаях совпадают с показателями по республике: в Согдийской области эти пики регистрировали в 2004 г. (2 очага) и 2008 г. (4 очага – соответствует), в Хатлонской области – 2002 г. (7 очагов – соответствует) и 2007 г. (8 очагов), в РРП – 2013 г. (3 очага – соответствует). Графически периоды заболеваемости выражаются восходяще-нисходящей (волнообразной): Согдийская область – 2003–2006 гг., Хатлонская область – 2000–2004 и 2005–2009 гг., РРП – 2012–2014 гг.) и нисходящей (Согдийская область – 2008–2009 гг.) линиями. В целом по Таджикистану наблюдали 3 волны заболеваемости ОО: 2000–2005, 2006–2009, и 2012–2014 гг. Один очаг выявлен в 2018 г. в Хатлонской области.

Одними из последних описаны [15] вспышки оспы (по данным НЦДПБ, вызванные вирусом ОО), произошедшие в феврале 2018 г. в Дангаринском районе Хатлонской области в двух смешанных отарах среди 1,5–2-месячных ягнят раннего окота, заражение которых произошло на зимних пастбищах, причем источник установить не удалось (предполагают, что причиной могли стать инфицированные возбудителем кошары). Тяжесть клинических и патоморфологических изменений была обусловлена как вирулентностью циркулировавшего штамма, так и возрастом больных животных (падеж 50%), у которых отсутствовал колостральный иммунитет, а резистентность организма была низкой в результате недокорма молзивом и молоком. Хотя эти вспышки произошли в отарах одного хозяйства на расстоянии 10–12 км, однако связи между ними не установлено.

В 2002 г. (28 очагов – волнообразный период), 2007 г. (3 очага – восходящий), 2013 г. (4 очага – волнообразный) и 2019 г. (2 очага – восходящий период) в Таджикистане регистрировали пики заболеваемости ОК (рис. 4), которые складывались из показателей в Хатлонской области (пики: в 2002 г. – 20; 2013 и 2019 гг. – по 2 очага) и РРП (пики: в 2002 г. – 8; 2007 г. – 3 и 2013 г. – 2 очага). Волнообразный период заболеваемости ОК в 2001–2004 гг. был обусловлен ситуацией в РРП, а его пик – вспышкой в Хатлонской области, где в 2019 г. также наблюдали 2 очага ОК.

В 2000 г. в приграничных с Афганистаном районах Хатлонской области РТ выявляли несколько очагов оспы [10], в основном среди ангорских коз, заболеваемость и смертность которых составляли 90 и 26% соответственно. У животных отмечали характерные поражения значительной части бесшерстных участков кожи. Заболевание, наиболее тяжело протекавшее перед и во время окота, приводило к истощению, потере зрения, поражению вымени, снижению выработки молока, массовым абортам и бесплодию, а отход новорожденных козлят составлял 85–90%. На следующий (2001) год уже в 11 хозяйствах зарегистрировали ОК, которая в 2002 г. распространилась в двух регионах Таджикистана (Хатлонская область и РРП) среди местных пород в основном в осенне-зимний период, характеризуясь легким течением (смертность до 3%), причем монопатогенный возбудитель не передавался совместно содержащимся овцам.

При выделении во ВНИИВВиМ (г. Покров, Россия) возбудителя методом электронной микроскопии в патологическом материале обнаружили характерные для ОК вирионы кирпичеобразной формы (180–320 нм) с округлыми краями, титр антигена вируса при постановке твердофазного иммуноферментного анализа составлял 1:32–1:64 [16–18]. Большинство штаммов капripоксвирусов является видоспецифичными, но некоторые из них могут вызывать болезнь как у овец, так и у коз. Изолированный в РТ в 2002 г. штамм «Дангаринский» вируса ОК был патогенен как для коз, так и для овец, причем первые после развития полного симптомокомплекса заболевания погибали, а вторые переболели в легкой форме (без проявления характерных

клинических признаков), что свидетельствовало о возможной циркуляции вируса среди неиммунных овец, которые могли быть источником возбудителя в межэпизоотический период [10, 16, 19]. Однако, несмотря на высокую степень антигенного родства, вирусы ОО и ОК филогенетически различны, причем последний, часто вызывая более тяжелую форму болезни, обуславливает высокую смертность молодняка и значительные экономические потери.

Полученные с использованием вирулентных вирусов ОО и ОК специфические сыворотки нейтрализовали адаптированные к перевиваемой культуре клеточек ПО штаммы «Б/5-96» вируса ОО и «Дангаринский» вируса ОК в титрах 1:32 и 1:64 соответственно [17, 20].

Таблица 2

Эпизоотическая ситуация по оспе овец и оспе коз в Республике Таджикистан (2000–2021 гг.)

Table 2

Epizootic situation on sheep pox and goat pox in the Republic of Tajikistan (2000–2021)

Годы	Область				РРП			Таджикистан			
	Согдийская	Хатлонская			ОО	ОК	ОО + ОК	ОО	ОК	ОО + ОК	
		ОО	ОК	ОО + ОК							
2000		2		2				2		2	
2001	1	5		5		2	2	6	2	8	
2002		7	20	27		8	8	7	28	35	
2003	1	5		5		3	3	6	3	9	
2004	2	1		1		2	2	3	2	5	
2005	1	1		1				2		2	
2006	1	3		3		1	1	4	1	5	
2007		8		8	1	3	4	9	3	12	
2008	4	6		6				10		10	
2009	2	3		3	1		1	6		6	
2010						1	1		1	1	
2011											
2012					1	1	2	1	1	2	
2013	1	1	2	3	3	2	5	5	4	9	
2014	1	1	1	2	1		1	3	1	4	
2015											
2016											
2017											
2018		1	1	2				1	1	2	
2019			2	2					2	2	
2020											
2021											
Всего	очагов	14	44	26	70	7	23	30	65	49	114
	лет	наблюдения	22	22	22	22	22	22	22	22	22
		регистрации болезни	9	13	5	14	5	9	11	14	12
ИС		0,41	0,59	0,23	0,64	0,23	0,41	0,50	0,64	0,55	0,73
Среднее ежегодное количество очагов за период	регистрации болезни	1,56	3,38	5,20	5,00	1,40	2,56	2,73	4,64	4,08	7,13
	наблюдения	0,64	2,00	1,18	3,18	0,23	1,05	1,36	2,95	2,23	5,18

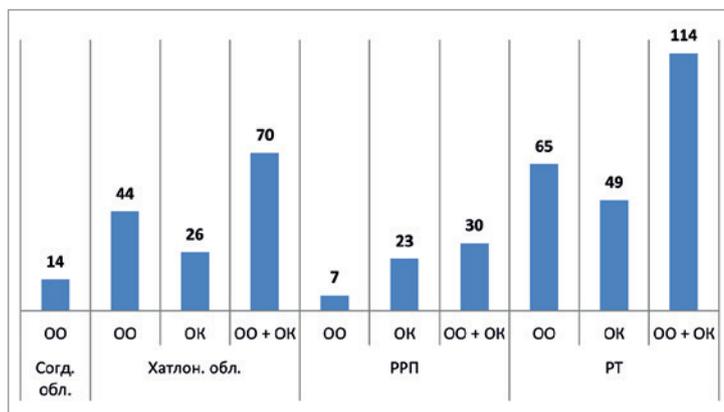


Рис. 1. Количество очагов оспы овец и оспы коз, выявленных в Республике Таджикистан в 2000–2021 гг.

Fig. 1. Number of sheep pox and goat pox outbreaks reported in the Republic of Tajikistan in 2000–2021

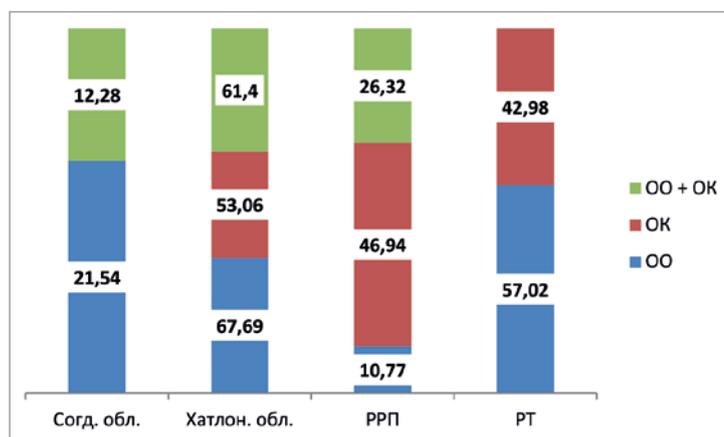


Рис. 2. Удельный вес очагов оспы овец и оспы коз в Республике Таджикистан в 2000–2021 гг. (%)

Fig. 2. Proportion of sheep pox and goat pox outbreaks in the Republic of Tajikistan in 2000–2021 (%)

В сумме очаги ОО и ОК дали 3 волны (периода) заболеваемости МРС этими инфекциями в Таджикистане (рис. 4): 2000–2005 гг. (пик в 2002 г. – 35 очагов), 2006–2010 гг. (пик в 2007 г. – 12 очагов) и 2012–2014 гг. (пик в 2013 г. – 9 очагов). В 2018 г. было зарегистрировано по 1 очагу ОО и ОК, в 2019 г. – 2 очага ОК. В Хатлонской области наблюдали 2 волны (периода) заболеваемости в 2000–2005 гг. (пик в 2002 г. – 27 очагов), 2006–2009 гг. (пик в 2007 г. – 8 очагов) и нисходящий период с 2013 (3 очага) по 2014 г. (2 очага). Заболеваемость в РРП графически выражалась 2 волнами (периодами) в 2001–2004 гг. с пиком в 2002 г. (8 очагов) и 2012–2014 гг. с пиком в 2013 г. (5 очагов), а также одним восходящим периодом в 2006–2007 гг. (1 и 4 очага соответственно). Кроме того, в этом регионе было выявлено по 1 очагу в 2009 и 2010 гг.

В результате анализа динамики и структуры нозареала оспы в РТ в 1991–2011 гг. установлено усиление напряженности эпизоотической обстановки, которая характеризовалась трендом роста инцидентности вспышек, однако тренд показателя индекса заболеваемости был нисходящим. Определенные для Таджикистана временные циклы напряженности эпи-

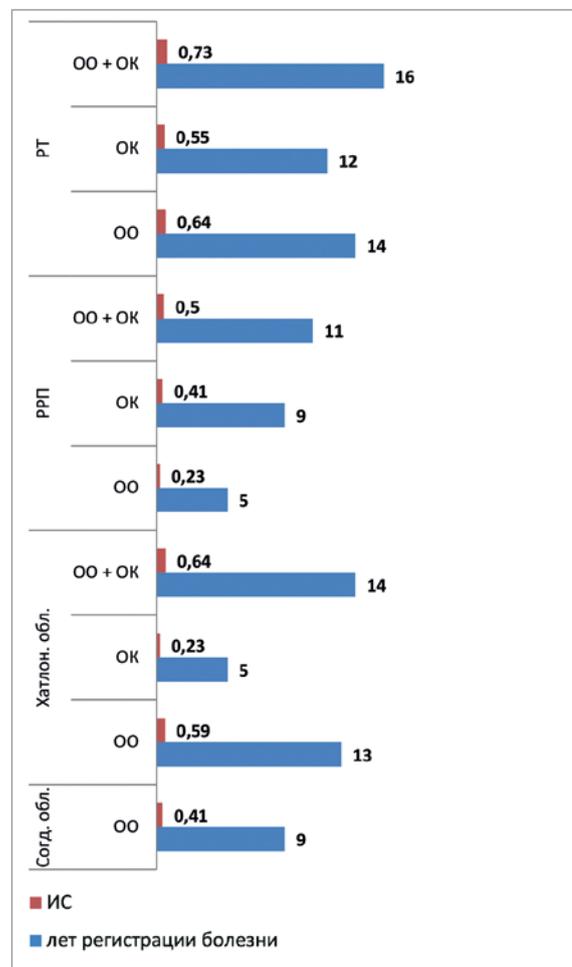


Рис. 3. Период регистрации (лет) и индекс стационарности оспы овец и оспы коз в Республике Таджикистан в 2000–2021 гг.

Fig. 3. Reporting period duration (years) and stationarity index for sheep pox and goat pox in the Republic of Tajikistan in 2000–2021

зоотического процесса составляли 6–8 и 14–16 лет. При экстраполяции динамических моделей на период до 2015 г. показатель инцидентности вспышек составил от 0 до 10 на 1 млн гол., индекс заболеваемости – 1–10 случаев на 100 тыс. гол. МРС ($P > 0,75$). Факторы природного и социально-экономического фона существенно влияли на территориальное распределение показателей напряженности эпизоотического процесса: ИС – 0,437, ИИ вспышек – 0,478 и индекс заболеваемости – 0,45 ($\alpha < 0,005 - 0,01$). Вероятность возникновения ОО и ОК на территории РТ для Хатлонской, юга и юго-запада Горно-Бадахшанской автономной области составила 0,6–0,8 (выше среднего), для Согдийской области и РРП – 0,4–0,6 (средний) [13].

Анализ динамики эпизоотического процесса ОО в Таджикистане в 2000–2021 гг. выявил, что он в 2000–2009 гг. в основном определялся ситуацией в Хатлонской области, причем в Согдийской области обстановка имела схожие тенденции в 2003–2005, 2008 и 2009 гг., а в РРП – в 2012–2014 гг. Развитие эпизоотического процесса ОК в РРП в 2001–2004, 2006, 2007, 2012, 2013 гг. формировало соответствующую ситуацию в РТ, которая корректировалась обстановкой в Хатлонской об-

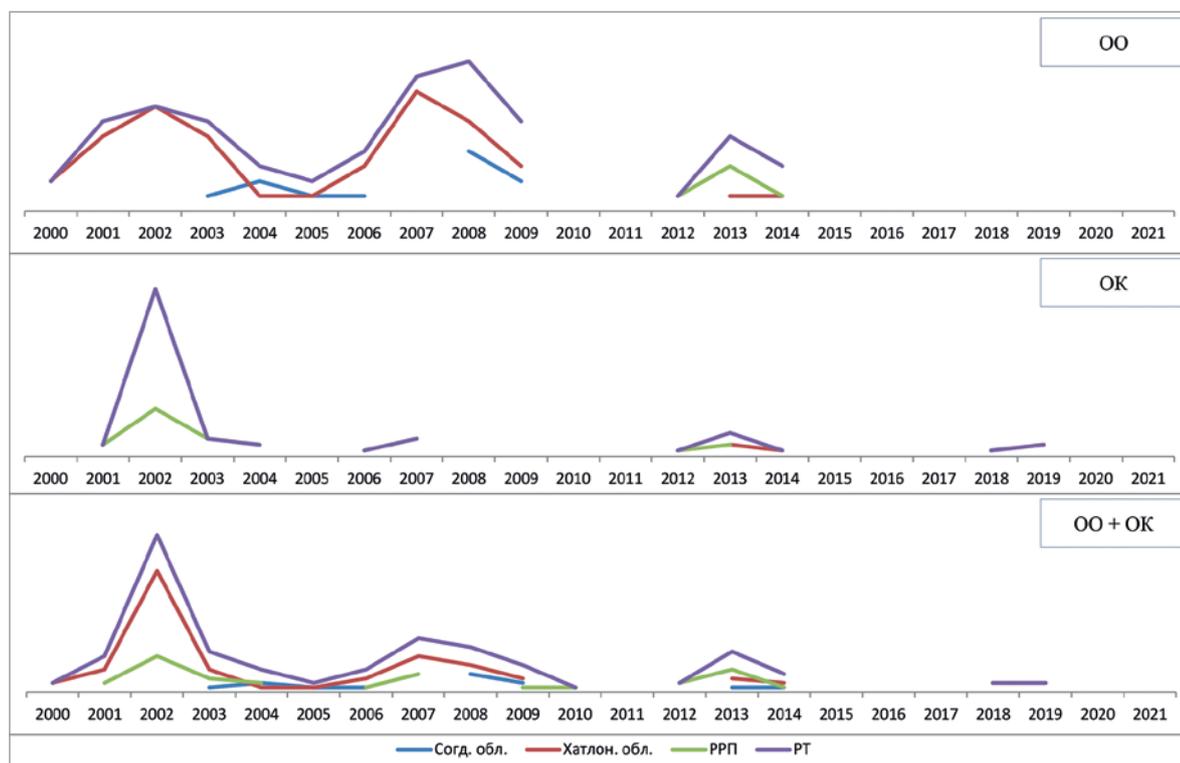


Рис. 4. Динамика эпизоотического процесса оспы овец и оспы коз в Республике Таджикистан в 2000–2021 гг. (очагу)

Fig. 4. Dynamics of sheep pox and goat pox epizootic process in the Republic of Tajikistan in 2000–2021 (outbreaks)

ласти в 2013, 2014, 2018 и 2019 гг. Безусловно, эпизоотический процесс ОО и ОК в Таджикистане зависит от ситуации в Хатлонской области, но по ОО на нее существенно влияет обстановка в Согдийской области, а по ОК – в РПП.

В результате циклических колебаний эпизоотической ситуации напряженность по ОО и ОК в 2017–2020 гг. снизилась: в 2017 г. очаги инфекции не реги-

стрировали, а в 2018 г. (ОО – 1, ОК – 1) и 2019 г. (ОК) их было по 2 в Хатлонской области, что подтверждает верность разработанной ранее модели развития потенциальных нозоареалов [1].

Среднее ежегодное количество очагов ОО и ОК за период регистрации болезни в РТ (рис. 5) составило 7,13 (ОО – 4,64; ОК – 4,08). Наибольшим данный показатель был в Хатлонской области (5,00: ОО – 3,38;

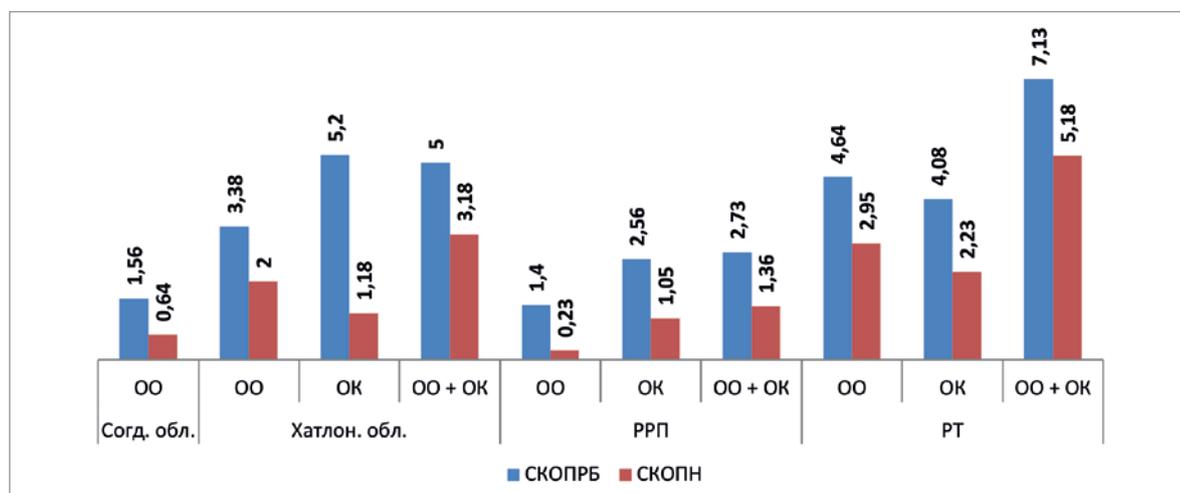


Рис. 5. Среднее ежегодное число очагов за периоды регистрации и наблюдения (2000–2021 гг.) оспы овец и оспы коз в Республике Таджикистан

Fig. 5. Average number of sheep pox and goat pox outbreaks (annually) in the reporting and observation periods (2000–2021) in the Republic of Tajikistan

ОК – 5,2), за которой в убывающем порядке следовали РПП (2,73; ОО – 1,40; ОК – 2,56) и Согдийская область (ОО – 1,56). Характерно, что в регионах распространения ОК этот показатель значительно превышал (в Хатлонской области в 1,5; РПП – в 1,8 раза) соответствующий для ОО. Среднее ежегодное количество очагов ОО и ОК за период наблюдения можно рассматривать как предварительное прогностическое: в целом по Таджикистану – 5,18 (ОО – 2,95; ОК – 2,23), в регионах – от 0,64 (ОО) в Согдийской области до 3,18 (ОО – 2,00; ОК – 1,18) в Хатлонской области, соответствующие значения для РПП составили 1,36 (ОО – 0,23; ОК – 1,05).

Анализ динамики эпизоотической обстановки по ОО и ОК в Таджикистане в 2000–2021 гг. выявил основные причины вспышек этих заболеваний: 1) охват вакцинацией не всего поголовья; 2) иммунизация без расчета на выработку колюстрального иммунитета; 3) контакт здоровых животных с больными при перегоне на пастбища (зимние и летние) и при выпасе на высокогорных (летних) пастбищах; 4) выпас МРС на стационарно неблагополучных по ОО и ОК приграничных с Афганистаном пастбищах; 5) вакцинация ослабленных животных; 6) нарушение ветеринарно-санитарных и карантинных правил.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Особенности и закономерности распространения и проявления эпизоотического процесса при ОО и ОК, определенные при системном эпизоотологическом анализе структуры и динамики нозоареалов, результаты оценки риска заноса, возникновения и распространения (с учетом климатогеографических, социально-экономических и организационно-хозяйственных факторов), мониторинга и определения неблагополучных и эндемичных по ОО и ОК зон подтверждают необходимость системного подхода к эпизоотологическому надзору за особо опасными и экономически значимыми инфекционными заболеваниями, имеющими тенденцию к трансграничному распространению, который будет способствовать решению проблемы анализа возможных угроз и реализации ветеринарно-санитарных мероприятий в случае возникновения заболевания на территории любой страны для сохранения эпизоотологического благополучия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Книзе А. В., Болгова М. В., Париллов С. В., Тураев Р. А., Абдуллоев А. О., Балышев В. М. Анализ эпизоотической ситуации и моделирование потенциальных нозоареалов оспы и чумы мелких жвачных животных до 2020 года. *Ветеринарный врач*. 2016; 1: 11–17. eLIBRARY ID: 25808506.
- Книзе А. В., Гузалова А. Г. Система анализа риска возникновения и распространения экзотических особо опасных и малоизвестных болезней животных. *Ветеринария*. 2016; 6: 23–26. eLIBRARY ID: 26556046.
- Toma B., Dufour B., Sanaa M., Bénet J., Ellis P. M., Moutou F., Louzā A. Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures. *Med. Mal. Infect.* 1996; 26 (Suppl. 5): 686. DOI: 10.1016/S0399-077X(96)80098-9.
- Бакулов И. А., Книзе А. В., Стрижаков А. А., Дмитренко Н. В., Филоматова В. А. Методические рекомендации по ведению эпизоотологического мониторинга экзотических особо опасных и малоизвестных болезней животных: утв. отделением ветеринарной медицины Россельхозакадемии 12.12.2007. Покров: ГНУ ВНИИВВиМ; 2007. 79 с.
- OIE. Terrestrial Animal Health Code. Режим доступа: <https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access>.
- Руководство по общей эпизоотологии. Под ред. И. А. Бакулова, А. Д. Третьякова. М.: Колос; 1979. 429 с.
- Ванновский Т. Я. Оспа коз и ее специфическая профилактика: автореф. дис. ... д-ра вет. наук. Воронеж; 1966. 43 с.

8. Лихачев Н. В., Борисович Ю. Ф., Ислентьева К. М. О качестве ГОА формолавакцины против оспы овец. *Труды Государственного научно-контрольного института ветеринарных препаратов МСХ СССР*. 1967; 14: 46–50.

9. Кадыров У. Г., Борисович Ю. Ф. Оспа животных. М.: Колос; 1981. 167 с.

10. Сатторов И. Т., Хухоров И. Ю., Болтаев С. П., Сатторов Н. Р., Носиров С. Оспа коз в Таджикистане. *Ветеринария*. 2003; 6: 12–14. eLIBRARY ID: 16895375.

11. Хухоров И. Ю. Оспа овец в странах СНГ. *Биолого-экологические проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии сельскохозяйственных животных и людей: материалы Международной научно-практической конференции (16–18 апреля 2002 г.)*. Покров; 2002; 206–212.

12. Мурватуллоев С. А., Насруллоев И. Х., Махмадшоев А. Н. Эпизоотология оспы овец и коз в Таджикистане. *Доклады Таджикской академии сельскохозяйственных наук*. 2016; 1 (47): 57–60. eLIBRARY ID: 27496884.

13. Тураев Р. А. Эпизоотологический мониторинг оспы мелкого рогатого скота в Республике Таджикистан и ее специфическая профилактика: автореф. дис. ... канд. вет. наук. Душанбе; 2012. 25 с. Режим доступа: <https://viewer.rusneb.ru/ru/rs101005046284?page=6&rotate=0&theme=white>.

14. Париллов С. В., Книзе А. В., Балышев В. М. Анализ и прогноз мировой эпизоотической ситуации по оспе овец и коз и чуме мелких жвачных животных в 2011–2015 гг. *Научный журнал КубГАУ*. 2011; 69 (05). Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2011/05/pdf/21.pdf>.

15. Насруллоев И. Х. Эпизоотология и специфическая профилактика оспы овец и оспы коз в Таджикистане: автореф. дис. ... канд. вет. наук. Душанбе; 2020. 56 с.

16. Балышев В. М., Хухоров И. Ю., Грачев Д. В., Жуков А. Н., Стрижакова О. М., Юрков С. Г. и др. Иммунобиологические свойства вируса оспы коз, выделенного в Таджикистане. *Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук*. 2005; 1: 54–56. eLIBRARY ID: 18196107.

17. Грачев Д. В. Иммунобиологические свойства вируса оспы коз, выделенного в Республике Таджикистан: дис. ... канд. вет. наук. Покров; 2006. 125 с.

18. Поксвирусные инфекции. В кн.: *Сюрин В. Н., Самуйленко А. Я., Соловьев Б. В., Фомина Н. В. Вирусные болезни животных*. М.: ВНИТИБП; 1998; 722–769.

19. Стрижакова О. М., Куриннов В. В., Хухоров И. Ю., Балышев В. М., Юрков С. Г., Неверовская Н. И. и др. Выделение и адаптация к перевиваемой культуре клеток изолята «Дангаринский» вируса оспы коз. *Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов: труды Международной научно-практической конференции, посвященной 45-летию института (24–26 сентября 2003 г.)*. Ч. 2. Покров: ВНИИВВиМ; 2003; 529–534.

20. Грачев Д. В. Адаптация вируса оспы коз к первичным и перевиваемым культурам клеток. *Проблемы мониторинга и генодиагностики инфекционных болезней животных: материалы Международной научной конференции молодых ученых (24–26 марта 2004 г.)*. Владимир: ФГУ «ВНИИЗЖ»; 2004; 97–99.

REFERENCES

- Kneize A. V., Bolgova M. V., Parilov S. V., Turayev R. A., Abdulloev A. O., Balyshchev V. M. Sheep and goat pox and peste des petits ruminants: epidemiological analysis and forecasting potential nosoareas up to 2020. *Veterinarian*. 2016; 1: 11–17. eLIBRARY ID: 25808506. (in Russ.)
- Kneize A. V., Guzalova A. G. Risk analysis system for emergence and spread of exotic highly dangerous animal diseases. *Veterinariya*. 2016; 6: 23–26. eLIBRARY ID: 26556046. (in Russ.)
- Toma B., Dufour B., Sanaa M., Bénet J., Ellis P. M., Moutou F., Louzā A. Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures. *Med. Mal. Infect.* 1996; 26 (Suppl. 5): 686. DOI: 10.1016/S0399-077X(96)80098-9.
- Bakulov I. A., Kneize A. V., Strizhakov A. A., Dmitrenko N. V., Filomatova V. A. Metodicheskie rekomendatsii po vedeniyu epizootologicheskogo monitoringa ekzoticheskikh osobo opasnykh i maloizvestnykh boleznei zhivotnykh = Methodical guidelines for conducting epizootological monitoring of exotic highly dangerous and little-known animal diseases: approved by Department of Veterinary Medicine of the Russian Agricultural Academy on December 12, 2007. Pskov: SRI RIVVaM; 2007. 79 p. (in Russ.)
- OIE. Terrestrial Animal Health Code. Available at: <https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access>.
- Rukovodstvo po obshchei epizootologii = Manual on general epizootology. Ed. by I. A. Bakulov, A. D. Tret'yakov. Moscow: Kolos; 1979. 429 p. (in Russ.)
- Vannovskii T. Ya. Ospa koz i ee spetsificheskaya profilaktika = Goat pox and its specific prophylaxis: author's thesis ... Doctor of Science (Veterinary Medicine). Voronezh; 1966. 43 p. (in Russ.)

8. Likhachev N. V., Borisovich Yu. F., Islent'eva K. M. O kachestve GOA formolvaksiny protiv ospy ovets = On quality of GOA-formol vaccine against sheep pox. *Trudy Gosudarstvennogo nauchno-kontrol'nogo instituta veterinarnykh preparatov MSKh SSSR*. 1967; 14: 46–50. (in Russ.)
9. Kadyrov U. G., Borisovich Yu. F. Ospa zhivotnykh = Pox in animals. Moscow: Kolos; 1981. 167 p. (in Russ.)
10. Sattorov I. T., Khukhorov I. Yu., Boltaev S. P., Sattorov N. R., Nosirov S. Goat pox in Tajikistan. *Veterinariya*. 2003; 6: 12–14. eLIBRARY ID: 16895375. (in Russ.)
11. Khukhorov I. Yu. Ospa ovets v stranakh SNG = Sheep pox in CIS countries. *Biologo-ekologicheskie problemy zaraznykh boleznei dikikh zhivotnykh i ikh rol' v patologii sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh i lyudei = Biological and ecological problems of wild animal contagious diseases and their role in pathology of livestock animals and humans: proceedings of the International Scientific and Practical Conference (April 16–18, 2002)*. Pokrov; 2002; 206–212. (in Russ.)
12. Murvatulloev S. A., Nasrulloev I. Kh., Mahmadoev A. Epizootology of sheep pox and goats pox in Tajikistan. *Reports of the Tajik Academy of Agricultural Sciences*. 2016; 1 (47): 57–60. eLIBRARY ID: 27496884. (in Russ.)
13. Turaev R. A. Epizootologicheskii monitoring ospy melkogo rogatogo skota v Respublike Tadjikistan i ee spetsificheskaya profilaktika = Epizootological monitoring of small ruminant pox in the Republic of Tajikistan and its specific prophylaxis: author's thesis ... Candidate of Science (Veterinary Medicine). Dushanbe; 2012. 25 p. Available at: <https://viewer.rusneb.ru/ru/rsl01005046284?page=6&rotate=0&theme=white>. (in Russ.)
14. Parilov S. V., Knize A. V., Balyshv V. M. Worldwide distribution analysis & prognosis for sheep & goat pox and peste des petits ruminants in 2011–2015. *Scientific Journal of KubSAU*. 2011; 69 (05). Available at: <http://ej.kubagro.ru/2011/05/pdf/21.pdf>. (in Russ.)
15. Nasrulloev I. Kh. Epizootologiya i spetsificheskaya profilaktika ospy ovets i ospy koz v Tadjikistane = Epizootology and specific prophylaxis of sheep pox and goat pox in Tajikistan: author's thesis ... Candidate of Science (Veterinary Medicine). Dushanbe; 2020. 56 p. (in Russ.)
16. Balyshv V. M., Khukhorov I. Yu., Grachev D. V., Zhuckov A. N., Strizhakov O. M., Yurkov S. G., et al. Immunobiological characteristics of goat pox virus isolated in Tajikistan. *Russian Agricultural Sciences*. 2005; 1: 54–56. eLIBRARY ID: 18196107. (in Russ.)
17. Grachev D. V. Immunobiologicheskie svoistva virusa ospy koz, vydelennogo v Respublike Tadjikistan = Immunobiological properties of goat pox virus isolated in the Republic of Tajikistan: thesis ... Candidate of Science (Veterinary Medicine). Pokrov; 2006. 125 p. (in Russ.)
18. Family Poxviridae. In: Syurin V. N., Samuilenko A. Ya., Solov'ev B. V., Fomina N. V. *Virusnye bolezni zhivotnykh = Viral animal diseases*. Moscow: VNIITBP; 1998; 722–769. (in Russ.)
19. Strizhakova O. M., Kurinnov V. V., Khukhorov I. Yu., Balyshv V. M., Yurkov S. G., Neverovskaya N. I., et al. Vydelenie i adaptatsiya k perevivaemoi kul'ture kletok izolyata «Dangarinskii» virusa ospy koz = Isolation and adaptation of goat pox virus strain Dangarinsky to continuous cell culture. *Veterinarnye i meditsinskie aspekty zoonozov = Veterinary and medical aspects of zoonoses: Proceedings of the International Scientific and Practical Conference dedicated to the 45th anniversary of the Institute (September 24–26, 2003). Part 2*. Pokrov: VNIIViM; 2003; 529–534. (in Russ.)
20. Grachev D. V. Adaptatsiya virusa ospy koz k pervichnym i perevivaemym kul'turam kletok = Adaptation of goat pox virus to primary and continuous cell cultures. *Problemy monitoringa i genodiagnostiki infektsionnykh boleznei zhivotnykh = Problems of monitoring and gene diagnosis of infectious animal diseases: Proceedings of the International Scientific Conference of Young Scientists (March 24–26, 2004)*. Vladimir: FGI "ARRIAH"; 2004; 97–99. (in Russ.)

Поступила в редакцию / Received 20.10.2021

Доработана после рецензирования / Revised 26.11.2021

Принята к публикации / Accepted 14.12.2021

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ / INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Атовуллозода Раджабмурод Атовулло, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусологии ИВМ ТАСХН, г. Душанбе, Республика Таджикистан.

Rajabmurod Atovullozoda, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Virology, Institute of Veterinary Medicine of the Tajik Academy of Agricultural Sciences, Dushanbe, Republic of Tajikistan.



Изучение иммунного ответа цыплят после экспериментального заражения изолятами вируса гриппа птиц А/Н9N2

О. С. Осипова¹, М. А. Волкова², С. В. Фролов³, Д. Б. Андрейчук⁴, И. А. Чвала⁵

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0002-3176-157X>, e-mail: osipova@arriah.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-7674-639X>, e-mail: volkovama@arriah.ru

³ <https://orcid.org/0000-0001-6802-9940>, e-mail: frolov@arriah.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-1681-5795>, e-mail: andreychuk@arriah.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>, e-mail: chvala@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Представлены данные по изучению параметров иммунного ответа цыплят после инфицирования изолятами низкопатогенного вируса гриппа птиц подтипа А/Н9N2, относящимися к генетическим линиям Y-280 и G1. Для первичного исследования иммунного статуса и выявления выраженных нарушений иммунной системы были определены соотношения CD4⁺/CD8⁺ клеток методом проточной цитофлуориметрии. В результате количественного анализа субпопуляций лимфоцитов периферической крови цыплят обнаружено наличие изменений, характерных для иммунной супрессии. При изучении динамики уровня Т- и В-лимфоцитов в крови инфицированных цыплят установлено снижение относительного количества Т-лимфоцитов и увеличение относительного количества В-лимфоцитов в крови. После инфицирования изменение субпопуляционного состава Т-лимфоцитов в процентном соотношении CD4⁺/CD8⁺ клеток отмечено в сторону уменьшения процента CD4⁺ клеток и увеличения процента CD8⁺ клеток. Согласно литературным данным, при иммунизации вакцинами активация иммунного ответа приводит к обратной динамике в сторону увеличения отношения CD4⁺/CD8⁺ клеток. В формировании иммунного ответа у цыплят после инфицирования вирусами гриппа птиц играет роль не только клеточно-опосредованный, но и гуморальный иммунитет. В результате серологических исследований сывороток крови цыплят после инфицирования на 14-е сут установлен выраженный гуморальный иммунный ответ. Средний титр специфических антител к вирусу гриппа птиц подтипа А/Н9N2 во всех группах цыплят, зараженных изолятами низкопатогенного вируса гриппа птиц, был выше 6 log₂. Высокий уровень специфических антител к вирусу гриппа птиц показал развитие постинфекционного гуморального иммунного ответа.

Ключевые слова: вирус гриппа птиц, H9N2, Т-клетки

Благодарности: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Осипова О. С., Волкова М. А., Фролов С. В., Андрейчук Д. Б., Чвала И. А. Изучение иммунного ответа цыплят после экспериментального заражения изолятами вируса гриппа птиц А/Н9N2. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (1): 70–76. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-70-76.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Осипова Ольга Сергеевна, ветеринарный врач референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьеvec, e-mail: osipova@arriah.ru.

Testing of chickens experimentally infected with A/H9N2 avian influenza virus isolates for their immune responses

O. S. Osipova¹, M. A. Volkova², S. V. Frolov³, D. B. Andreychuk⁴, I. A. Chvala⁵

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ <https://orcid.org/0000-0002-3176-157X>, e-mail: osipova@arriah.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-7674-639X>, e-mail: volkovama@arriah.ru

³ <https://orcid.org/0000-0001-6802-9940>, e-mail: frolov@arriah.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-1681-5795>, e-mail: andreychuk@arriah.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>, e-mail: chvala@arriah.ru

SUMMARY

Data on tests of chickens for their immune responses to infection with low pathogenic A/H9N2 avian influenza virus isolates belonging to Y-280 and G1 genetic lines are presented in the paper. CD4⁺/CD8⁺ ratios were determined with flow cytometry for initial immune status examination and for detection of apparent immune

system disorders. Quantitative analysis of peripheral blood lymphocyte subpopulations in chickens revealed changes characteristic of the immune suppression. Analysis of dynamics of T- and B-lymphocyte levels in blood of the infected chickens revealed decrease in relative T-lymphocyte counts and increase in relative B-lymphocyte counts. T-lymphocyte subpopulation composition expressed as CD4⁺/CD8⁺ ratio (%) changed after the infection: CD4⁺ cell proportion was found to decrease whereas CD8⁺ cell proportion increased. According to literature data, immune response activated by vaccination induces the reverse dynamics towards to increase in CD4⁺/CD8⁺ ratio. Both cell-mediated immunity and humoral immunity play role in development of the immune response in chickens infected with avian influenza viruses. Apparent humoral immune response was detected by serological tests of sera taken from chickens on day 14 after infection. Mean specific anti-A/H9N2 AIV antibody titre in all groups of test chickens infected with low pathogenic avian influenza virus isolates was higher than 6 log₂. High level of specific antibodies to avian influenza virus was indicative of postvaccinal humoral immune response development.

Keywords: avian influenza virus (AIV), H9N2, T-cells

Acknowledgements: The study was funded by the FGBl "ARRIAH" within the framework of "Veterinary Welfare" research work.

For citation: Osipova O. S., Volkova M. A., Frolov S. V., Andreychuk D. B., Chvala I. A. Testing of chickens experimentally infected with A/H9N2 avian influenza virus isolates for their immune responses. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (1): 70–76. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-70-76.

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

For correspondence: Olga S. Osipova, Veterinarian, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBl "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: osipova@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус низкопатогенного гриппа птиц А/Н9N2 – РНК-содержащий вирус, относящийся к семейству *Orthomyxoviridae*, роду *Alphainfluenzavirus*, виду *Influenza A virus* [1]. Впервые был зарегистрирован в 1966 г. у птиц в США в штате Висконсин [2, 3]. С тех пор вирус низкопатогенного гриппа птиц А/Н9N2 получил широкое распространение во всем мире, особенно в странах Азии и Ближнего Востока [4–6]. В материковой части Китая вирус гриппа А/Н9N2 впервые был выделен в 1994 г. и стал наиболее распространенным подтипом вируса гриппа среди домашней птицы [4, 7].

Данный вирус является причиной развития клинически выраженной болезни при ассоциированном течении с оппортунистическими патогенами вирусной и бактериальной этиологии и создает постоянную угрозу для промышленного птицеводства [8–11]. Экономический ущерб складывается из следующих составляющих: повышенный отход молодняка, снижение яичной и мясной продуктивности в птицеводческих комплексах.

Для контроля данного заболевания многие страны (Китай, Пакистан, Иран, Израиль, Корея и др.) используют стратегию профилактической иммунизации против гриппа А/Н9N2 с целью уменьшения экономических потерь [2, 12–15]. В Российской Федерации ввиду циркуляции вируса А/Н9N2 программы оздоровления и искоренения инфекции могут включать стратегию иммунопрофилактики с использованием инактивированных вакцин [16].

Вакцинация индуцирует развитие и гуморального, и клеточного иммунитета. Основная роль в иммунном ответе, направленном против вирусов, принадлежит клеточным механизмам. Главными клетками приобретенного противовирусного иммунитета являются Т-лимфоциты. Среди них CD8⁺ Т-лимфоциты распознают чужеродные вирусные антигены в ассоциации с молекулами гистосовместимости I класса и убивают

клетки, инфицированные вирусами. CD4⁺ Т-лимфоциты (Т-хелперы) распознают вирусные антигены, находящиеся на антигенпредставляющих клетках в ассоциации с молекулами гистосовместимости II класса, и выполняют роль помощников в синтезе В-лимфоцитами специфических противовирусных антител [17]. Специфический клеточно-опосредованный ответ определяется антигенраспознающими CD8⁺ Т-лимфоцитами [18, 19]. При инфицировании кур вирусами гриппа птиц А/Н7N9 и А/Н9N2 наблюдали увеличение относительного количества CD8⁺ Т-клеток, и было показано, что эти клетки могли обеспечивать антивирусную защиту [20, 21]. Однако, согласно литературным данным, при иммунизации цыплят против вируса гриппа птиц подтипа А/Н9N2 наблюдали увеличение относительного количества CD4⁺ Т-клеток и уменьшение CD8⁺ Т-клеток [21, 22]. Для первичного исследования иммунного статуса и выявления выраженных нарушений иммунной системы определяют соотношение CD4⁺/CD8⁺ Т-клеток. В опубликованных результатах исследований соотношение CD4⁺/CD8⁺ заметно повышалось после иммунизации и явно снижалось после заражения, что позволяло предположить усиление иммунитета при вакцинировании и подавление – при инфицировании [23–26]. Возможно, причиной недостаточного противовирусного иммунного ответа при вакцинации птиц и заражения поголовья в стадах вакцинированных птиц в Китае является дефицит CD8⁺ Т-клеток.

Важно изучение и гуморального иммунного ответа, так как вирус низкопатогенного гриппа птиц при ассоциированном течении с другими коинфекциями способен вызывать иммуносупрессию, а при подавлении иммунитета организма течение различных инфекционных болезней утяжеляется.

Таким образом, комплексное изучение параметров иммунного ответа цыплят при экспериментальном инфицировании низкопатогенным вирусом гриппа птиц А/Н9N2 представляет значительный интерес.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус. Для заражения в опыте использовали изоляты низкопатогенного вируса гриппа птиц подтипа А/Н9N2, относящиеся к генетическим линиям Y-280 (A/chicken/Tadjikistan/2379/2018, A/chicken/Primorsk/419/2018) и G1 (A/chicken/Chelyabinsk/30/2019), которые были выделены и идентифицированы в референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Вирусовыделение проводили в 10-суточных свободных от патогенной микрофлоры (СПФ) куриных эмбрионах. Из биологического материала готовили 10–20%-ю суспензию на фосфатно-буферном растворе (рН 7,2–7,4) и вводили в аллантоисную полость куриных эмбрионов в объеме 0,2 см³. От эмбрионов,

погибших после 24 ч инкубации и более, отбирали экстраэмбриональную жидкость (ЭЭЖ) с целью проведения последующих исследований. Для заражения цыплят использовали ЭЭЖ с инфекционной активностью 10⁶ ЭИД₅₀/см³, при этом титр гемагглютинирующей активности составлял 9 log₂.

Эксперимент на животных. В опыте использовали цыплят яичного кросса 30-суточного возраста, не имеющих антител к вирусу гриппа птиц и полученных из благополучных по инфекционным болезням хозяйств. Цыплята были разделены на три группы по 5 голов в каждой и содержались в изолированных боксах. Вирусосодержащую ЭЭЖ с инфекционной активностью 10⁶ ЭИД₅₀/см³ вводили цыплятам внутримышечно в объеме 0,5 см³. До заражения и в течение последующих

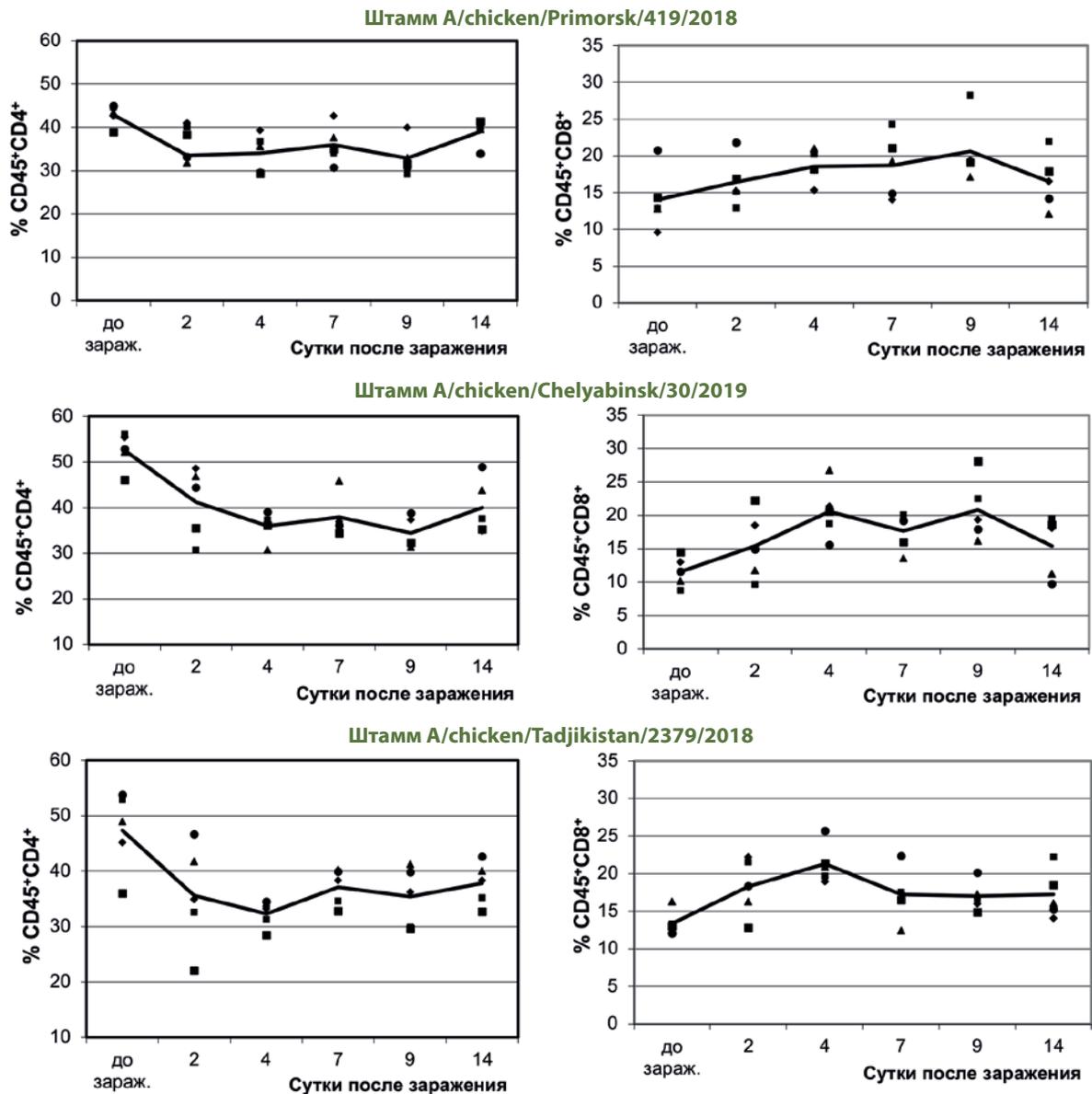


Рис. 1. Динамика уровня субпопуляций Т-лимфоцитов у цыплят после заражения изолятами вируса гриппа птиц подтипа Н9N2.

Сплошная линия – среднее арифметическое значение по группе из 5 цыплят; отдельные символы – процентное количество клеток для каждой птицы из группы

Fig. 1. Dynamics of T-cell subpopulations in chickens after their infection with H9N2 avian influenza virus isolates.

Solid line – arithmetic mean for group of 5 chickens; individual symbols – the percentage of cells for each chicken in the group

14 сут производили забор крови у цыплят для изучения иммунного ответа серологическим методом в реакции торможения гемагглютинации и методом проточной цитофлуориметрии.

Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с межгосударственными стандартами по содержанию и уходу за лабораторными животными, принятыми Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации, а также согласно требованиям Директивы Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, использующихся в научных целях.

Серологические исследования. Исследование сывороток крови, полученных до заражения и через 14 сут после заражения, на наличие антител к вирусу гриппа птиц подтипа А/Н9N2 проводили в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с использованием коммерческого набора производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир) в соответствии с инструкцией к нему. Перед исследованием сыворотки крови инактивировали прогреванием при температуре 56 °С в течение 30 мин. Учет реакции проводили визуально после полного оседания эритроцитов в контрольных лунках (в виде «пуговки»). Результат реакции считали положительным, если исследуемая сыворотка содержала специфические к вирусу гриппа птиц подтипа А/Н9N2 антитела в титре 1:16 ($4,0 \log_2$) и выше.

Количественный анализ субпопуляций лимфоцитов. Динамику изменения количественного соотношения популяций Т-лимфоцитов ($CD45^+CD3^+$, $CD45^+CD4^+$ и $CD45^+CD8^+$) и В-лимфоцитов ($CD45^+$, $CD45^+CD19^+$) в периферической крови цыплят изучали методом проточной цитофлуориметрии. Для этого кровь у цыплят отбирали до заражения и на 2, 4, 7, 9 и 14-е сут после заражения в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА К3.

Выделение лимфоцитов из периферической крови цыплят проводили по стандартной методике [27] с использованием среды для разделения лимфоцитов FicollPaque tm PLUS (BioWest, Франция). Подготовку проб для выявления поверхностных маркеров лимфоцитов осуществляли с использованием меченых моноклональных антител CD45-FITC, CD4-PE, CD8 α -PE, CD3-PE и Bu1a-PE (Southern biotech, США). Пробы лимфоцитов в объеме 50 мкл вносили в микропробирки в нескольких повторностях (в зависимости от количества используемых панелей антител). Добавляли по 2 мкл моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромом, и инкубировали в течение 30 мин при температуре 4–8 °С. Несвязавшиеся моноклональные антитела удаляли центрифугированием с фосфатно-буферным раствором в течение 10 мин при 260 g. Количественный анализ клеток проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Calibur (Becton Dickinson, США). Измерение и обработку полученных результатов осуществляли с использованием программного обеспечения Cell Quest Pro 1.0.

Статистический анализ результатов. Для статистической обработки данных использовали программу Statistica 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Была проведена оценка клеточного и гуморального иммунного ответа цыплят после заражения тремя различными изолятами вируса гриппа птиц подтипа H9N2.

После заражения на 4-е и 7-е сут у цыплят наблюдали клинические признаки заболевания: угнетенное состояние, взъерошенность оперения, отказ от корма. Гибели зараженных птиц не отмечено.

Для количественного анализа субпопуляций клеток лимфоцитов кровь, отобранную у цыплят до заражения и на 2, 4, 7, 9 и 14-е сут после заражения, исследовали методом проточной цитофлуориметрии.

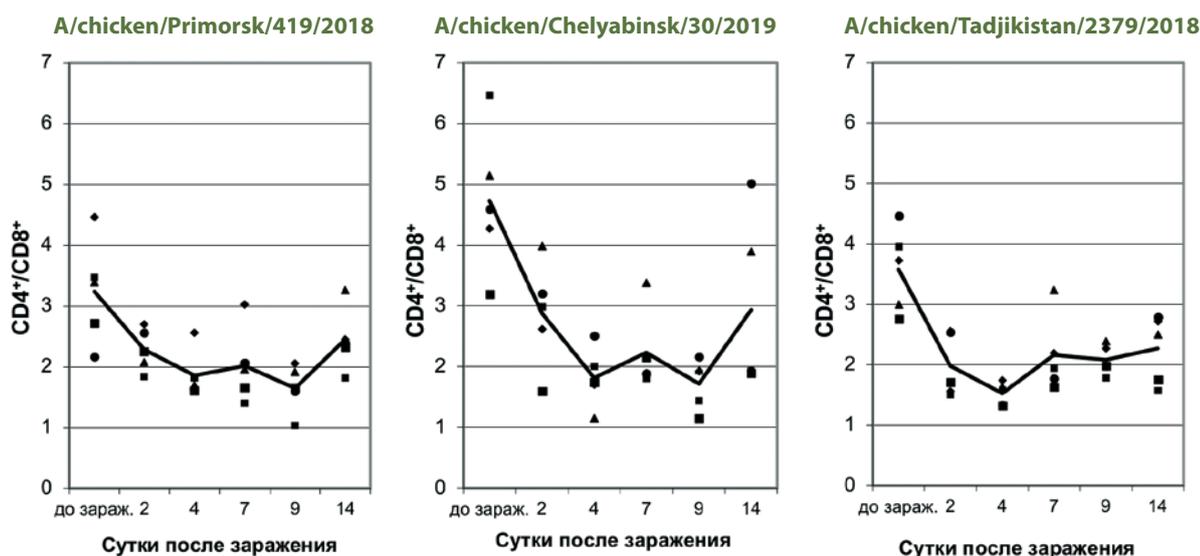


Рис. 2. Динамика отношения $CD4^+/CD8^+$ в лимфоцитах крови цыплят после заражения тремя изолятами вируса гриппа птиц подтипа H9N2. Сплошная линия – среднее арифметическое значение по группе из 5 цыплят; отдельные символы – процентное количество клеток для каждой птицы из группы

Fig. 2. Dynamics of $CD4^+/CD8^+$ ratio in chicken blood lymphocytes after infection with three H9N2 avian influenza virus isolates. Solid line – arithmetic mean for group of 5 chickens; individual symbols – the percentage of cells for each chicken in the group

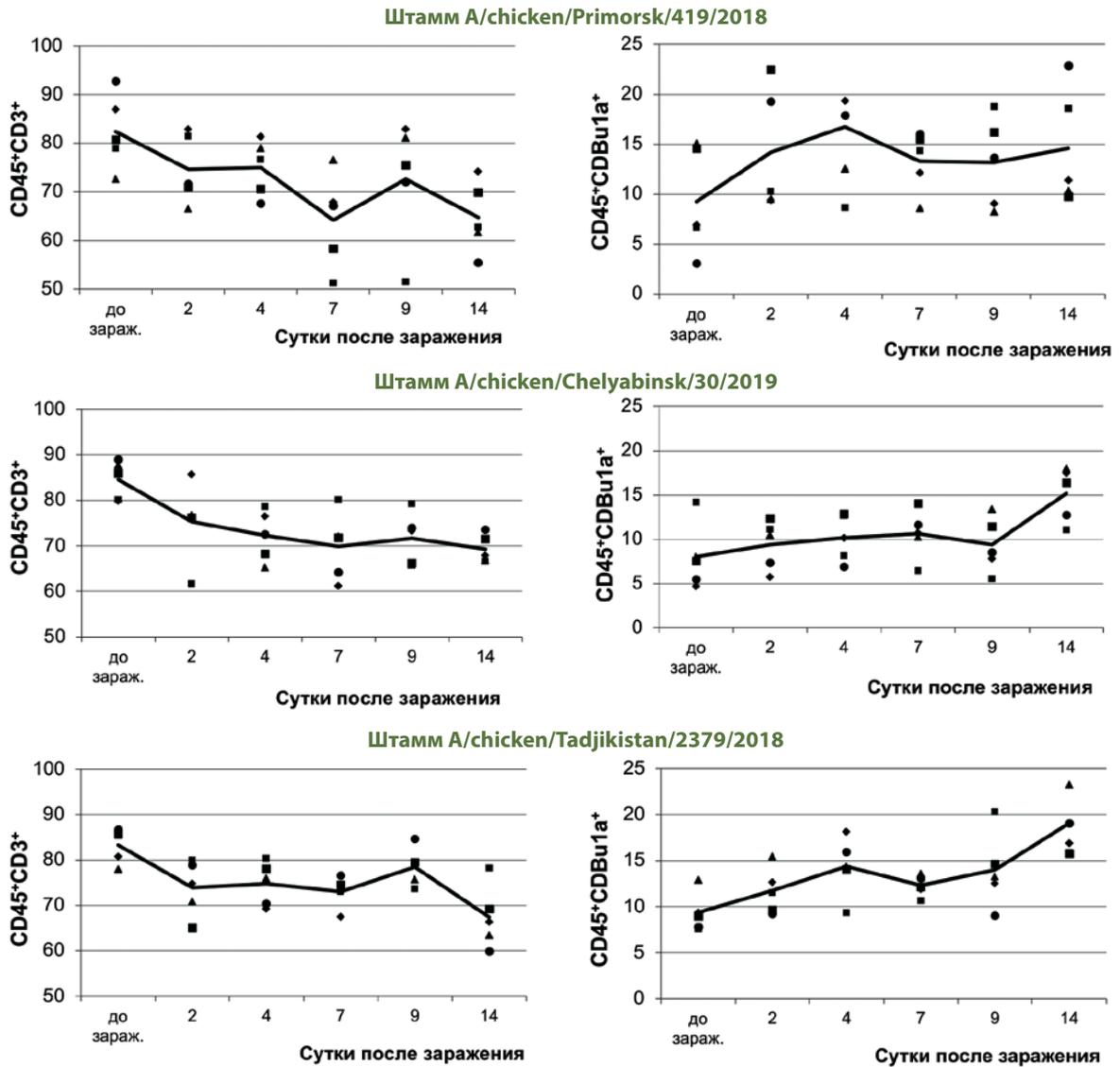


Рис. 3. Динамика уровня Т- и В-лимфоцитов в периферической крови цыплят после заражения тремя изолятами вируса гриппа птиц подтипа H9N2. Сплошная линия – среднее арифметическое значение по группе из 5 цыплят; отдельные символы – процентное количество клеток для каждой птицы из группы

Fig. 3. Dynamics of T- and B-lymphocyte levels in chicken peripheral blood after infection with three H9N2 avian influenza virus isolates. Solid line – arithmetic mean for group of 5 chickens; individual symbols – the percentage of cells for each chicken in the group

Через 2–4 сут после инфицирования в крови птиц регистрировали значительное снижение процента $CD45^+CD4^+$ Т-клеток (Т-хелперов) и увеличение процента $CD45^+CD8\alpha^+$ цитотоксических клеток (рис. 1). Относительное количество обеих популяций у инфицированных цыплят отличалось от первоначального уровня (до заражения) в 1,3–1,5 раза для Т-хелперов и в 1,3–1,9 раза для цитотоксических клеток.

Через 9 сут после заражения наблюдали увеличение уровня Т-хелперов в крови. Нормализацию объема обеих субпопуляций Т-лимфоцитов у инфицированных цыплят регистрировали к 14-м сут после заражения, но не у всех исследованных особей.

Развитие инфекционного процесса оказывало супрессивное влияние на иммунную систему зараженных цыплят. Полученные результаты о снижении относи-

тельной концентрации Т-хелперов в периферической крови после инфекции подтверждают данные таких исследователей, как X. Hao et al. [21] и M. Dai et al. [22]. Значительное повышение процента цитотоксических ($CD8^+$) Т-клеток в крови цыплят, инфицированных вирусом гриппа А/Н9N2, было также установлено M. Dai et al. на 5–7-е сут после заражения [22].

Анализ изменения отношения $CD4^+/CD8^+$ показал его снижение на 4-е сут после заражения у цыплят 1, 2 и 3-й группы в 1,9; 2,6 и 2,3 раза соответственно вследствие уменьшения относительного количества $CD4^+$ и увеличения объема $CD8\alpha^+$ Т-лимфоцитов (рис. 2). К 14-м сут после заражения показатель $CD4^+/CD8^+$ вновь увеличивался, но в среднем по группам его величина оставалась в 1,3–1,6 раза меньше первоначальных значений.

Yang Y. et al. [28] и Dai M. et al. [22] также показали, что вирусные инфекции у цыплят вызывают иммунную супрессию, которая выражалась в том числе снижением отношения CD4⁺/CD8⁺ в Т-лимфоцитах крови. Иммунизация вакцинами препаратами, наоборот, приводила к активации иммунного ответа и обратной динамике в сторону увеличения отношения CD4⁺/CD8⁺ [15, 22].

Xue M. et al. [23] и Yang S. et al. [24] считали, что увеличение отношения CD4⁺/CD8⁺ после иммунизации и снижение после инфицирования предполагало усиление иммунного ответа после вакцинирования и подавление иммунитета при вирусной инфекции. Вакцинация вызывала выраженный гуморальный иммунный и клеточный ответ CD4⁺ Т-клеток.

В исследованиях L. Fu et al. [25] и M. Dai et al. [26] было установлено, что вирусная инфекция в основном стимулировала CD8⁺ Т-клеточный ответ, а иммунизация – CD4⁺ Т-клеточный ответ. Высокий уровень антител к вирусу гриппа А/Н9N2 и повышение процента цитотоксических CD8⁺ Т-клеток играют важную роль в противовирусной защите [29, 30].

На рисунке 3 представлена динамика относительно количества Т- и В-лимфоцитов в крови инфицированных цыплят. Во всех трех группах отмечали снижение относительного количества Т-лимфоцитов в среднем на 15–20%, что может свидетельствовать о недостаточности клеточного иммунитета. Увеличение относительного количества В-лимфоцитов на 5–10% в зависимости от группы регистрировали только к 14-м сут после инфицирования. Наряду с увеличением процента Т-хелперов это свидетельствовало об активации иммунного ответа у инфицированных птиц.

Функция В-лимфоцитов, ответственных за гуморальный иммунитет, характеризуется преобразованием В-клеток в плазматические клетки, секретирующие иммуноглобулины, которые имеют специфическую активность против внедрившегося антигена. При изучении динамики относительного количества В-лимфоцитов в крови инфицированных цыплят было установлено их увеличение.

Сыворотки крови цыплят исследовали до и на 14-е сут после заражения в РТГА. Результаты выявления специфических антител к вирусу гриппа птиц подтипа А/Н9N2 представлены в таблице.

У цыплят на 14-е сут после заражения среднее значение титра антител в РТГА во всех группах было выше 6 log₂. Высокий уровень специфических антител к вирусу гриппа птиц показал развитие выраженного постинфекционного гуморального иммунного ответа.

Dai M. et al. [22] при сравнительном анализе ключевых факторов иммунной защиты цыплят, инфицированных вирусом А/Н9N2, и СПФ-цыплят, иммунизированных инактивированной вакциной, пришли к выводу, что недостаток CD8⁺ Т-клеток является ключевой причиной иммунодефицита и инфицирования поголовья в стадах вакцинированных птиц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе исследовали ключевые факторы иммунного ответа цыплят, инфицированных разными вирусами гриппа птиц подтипа А/Н9N2. Количественный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови цыплят, зараженных тремя изолятами вируса А/Н9N2, показал наличие изменений, вызванных вирусной инфекцией: снижение относительного

Таблица

Результаты исследований сывороток крови цыплят на наличие специфических антител к вирусу гриппа птиц подтипа А/Н9N2 в РТГА

Table

Results of HI tests of chicken sera for specific antibodies to А/Н9N2 avian influenza virus

Изолят	До заражения		14-е сут после заражения	
	Всего проб/положительных	Средний титр антител, log ₂	Всего проб/положительных	Средний титр антител, log ₂
A/chicken/Tadjikistan/2379/2018	15/0	0	15/15	8,7 ± 0,3
A/chicken/Primorsk/419/2018	15/0	0	15/15	8,1 ± 0,4
A/chicken/Chelyabinsk/30/2019	15/0	0	15/15	6,9 ± 0,4

количества Т-лимфоцитов в крови, существенное изменение субпопуляционного состава Т-лимфоцитов в сторону уменьшения процента CD4⁺ клеток и увеличения процента CD8⁺ клеток и, как следствие, снижения отношения CD4⁺/CD8⁺. При изучении динамики уровня Т- и В-лимфоцитов в крови инфицированных цыплят установлено снижение относительного количества Т-лимфоцитов и увеличение относительного количества В-лимфоцитов. Результаты серологических исследований в РТГА показали выраженный гуморальный иммунный ответ. При изучении иммунитета существенных различий между тремя разными изолятами низкопатогенного гриппа птиц А/Н9N2 в гуморальном и клеточном ответе не обнаружили.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Avian influenza (infection with avian influenza viruses). In: *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Chapter 3.3.4. Available at: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf.
2. Peacock T. H. P., James J., Sealy J. E., Iqbal M. A global perspective on H9N2 avian influenza virus. *Viruses*. 2019; 11 (7):620. DOI: 10.3390/v11070620.
3. Zhang P., Tang Y., Liu X., Liu W., Zhang X., Liu H., et al. A novel genotype H9N2 influenza virus possessing human H5N1 internal genomes has been circulating in poultry in eastern China since 1998. *J. Virol.* 2009; 83 (17): 8428–8438. DOI: 10.1128/JVI.00659-09.
4. Alexander D. J. Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa, and Australasia, 2002–2006. *Avian Dis.* 2007; 51 (1 Suppl): 161–166. DOI: 10.1637/7602-041306R.1.
5. Lee Y. J., Shin J. Y., Song M. S., Lee Y. M., Choi J. G., Lee E. K., et al. Continuing evolution of H9 influenza viruses in Korean poultry. *Virology*. 2007; 359 (2): 313–323. DOI: 10.1016/j.virol.2006.09.025.
6. Sun Y., Liu J. H9N2 influenza virus in China: a cause of concern. *Protein Cell*. 2015; 6 (1): 18–25. DOI: 10.1007/s13238-014-0111-7.
7. Li Y., Liu M., Sun Q., Zhang H., Zhang H., Jiang S., et al. Genotypic evolution and epidemiological characteristics of H9N2 influenza virus in Shandong Province, China. *Poult. Sci.* 2019; 98 (9): 3488–3495. DOI: 10.3382/ps/pez151.
8. Kishida N., Sakoda Y., Eto M., Sunaga Y., Kida H. Co-infection of *Staphylococcus aureus* or *Haemophilus paragallinarum* exacerbates H9N2 influenza A virus infection in chickens. *Arch. Virol.* 2004; 149 (11): 2095–2104. DOI: 10.1007/s00705-004-0372-1.
9. Mancini D. A., Mendonça R. M., Dias A. L., Mendonça R. Z., Pinto J. R. Co-infection between influenza virus and flagellated bacteria. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 2005; 47 (5): 275–280. DOI: 10.1590/s0036-46652005000500007.
10. Варкентин А. В., Волков М. С., Ирза В. Н. Низкопатогенный грипп птиц, вызванный вирусом подтипа Н9. Обзор литературы. *Труды федерального центра охраны здоровья животных*. 2014; 12: 41–53. eLIBRARY ID: 22516488.

- Varkentin A. V., Volkov M. S., Irza V. N. Low pathogenic avian influenza induced with subtype H9 virus. Review of published literature. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2014; 12: 41–53. eLIBRARY ID: 22516488. (in Russ.)
11. Hassan K. E., Ali A., Shany S. A. S., El-Kady M. F. Experimental co-infection of infectious bronchitis and low pathogenic avian influenza H9N2 viruses in commercial broiler chickens. *Res. Vet. Sci.* 2017; 115: 356–362. DOI: 10.1016/j.rvsc.2017.06.024.
12. Wang Y., Davidson I., Shkoda I., Golender N., Perk S., Lapin K., Khinich Y., Panshin A. Genetic characterization of HA gene of low pathogenic H9N2 influenza viruses isolated in Israel during 2006–2012 periods. *Virus Genes*. 2013; 46 (2): 255–263. DOI: 10.1007/s11262-012-0852-4.
13. Wang Y., Davidson I., Fouchier R., Spackman E. Antigenic cartography of H9 avian influenza virus and its application to vaccine selection. *Avian Dis.* 2016; 60 (1 Suppl): 218–225. DOI: 10.1637/11087-041015-Reg.
14. Hassan K. E., Shany S. A., Ali A., Dahshan A. H., El-Sawah A. A., El-Kady M. F. Prevalence of avian respiratory viruses in broiler flocks in Egypt. *Poult. Sci.* 2016; 95 (6): 1271–1280. DOI: 10.3382/ps/pew068.
15. Astill J., Alkie T., Yitbarek A., Taha-Abdelaziz K., Bavananthasivam J., Nagy É., et al. Induction of immune response in chickens primed *in ovo* with an inactivated H9N2 avian influenza virus unvaccinated. *BMC Res. Notes*. 2018; 11 (1):428. DOI: 10.1186/s13104-018-3537-9.
16. Волков М. С., Варкентин А. В., Ирза В. Н. О распространении вируса низкопатогенного гриппа А/Н9Н2 в мире и на территории Российской Федерации. Проблемы искоренения болезни. *Ветеринария сегодня*. 2019; (3): 51–56. DOI: 10.29326/2304-196X-2019-3-30-51-56.
- Volkov M. S., Varkentin A. V., Irza V. N. Spread of low pathogenic avian influenza A/H9N2 in the world and Russian Federation. Challenges of disease eradication. *Veterinary Science Today*. 2019; (3): 51–56. DOI: 10.29326/2304-196X-2019-3-30-51-56.
17. Julius M., Maroun C. R., Haughn L. Distinct roles for CD4 and CD8 as co-receptors in antigen receptor signalling. *Immunol. Today*. 1993; 14 (4): 177–183. DOI: 10.1016/0167-5699(93)90282-p.
18. Overgaard N. H., Jung J. W., Steptoe R. J., Wells J. W. CD4⁺/CD8⁺ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *J. Leukoc. Biol.* 2015; 97 (1): 31–38. DOI: 10.1189/jlb.1RU0814-382.
19. Kwon J. S., Lee H. J., Lee D. H., Lee Y. J., Mo I. P., Nahm S. S., et al. Immune responses and pathogenesis in immunocompromised chickens in response to infection with the H9N2 low pathogenic avian influenza virus. *Virus Res.* 2008; 133 (2): 187–194. DOI: 10.1016/j.virusres.2007.12.019.
20. Suarez D. L., Schultz-Cherry S. Immunology of avian influenza virus: a review. *Dev. Comp. Immunol.* 2000; 24 (2–3): 269–283. DOI: 10.1016/S0145-305X(99)00078-6.
21. Hao X., Li S., Chen L., Dong M., Wang J., Hu J., et al. Establishing a multicolor flow cytometry to characterize cellular immune response in chickens following H7N9 avian influenza virus infection. *Viruses*. 2020; 12 (12):1396. DOI: 10.3390/v12121396.
22. Dai M., Li S., Keyi Shi, Sun H., Zhao L., Deshui Yu, et al. Comparative analysis of key immune protection factors in H9N2 avian influenza viruses infected and immunized specific pathogen-free chicken. *Poult. Sci.* 2021; 100 (1): 39–46. DOI: 10.1016/j.psj.2020.09.080.
23. Xue M., Shi X., Zhao Y., Cui H., Hu S., Cui X., Wang Y. Effects of reticuloendotheliosis virus infection on cytokine production in SPF chickens. *PLoS One*. 2013; 8 (12):e83918. DOI: 10.1371/journal.pone.0083918.
24. Yang S., Li G., Zhao Z., Huang Z., Fu J., Song M., et al. Taishan *Pinus massoniana* pollen polysaccharides enhance immune responses in chickens infected by avian leukosis virus subgroup B. *Immunol. Invest.* 2018; 47 (5): 443–456. DOI: 10.1080/08820139.2018.1435689.
25. Fu L., Wang X., Zhai J., Qi W., Jing L., Ge Y., et al. Changes in apoptosis, proliferation and T lymphocyte subtype on thymic cells of SPF chickens infected with reticuloendotheliosis virus. *Mol. Immunol.* 2019; 111: 87–94. DOI: 10.1016/j.molimm.2019.04.003.
26. Dai M., Li S., Shi K., Liao J., Sun H., Liao M. Systematic identification of host immune key factors influencing viral infection in PBL of ALV-J infected SPF chicken. *Viruses*. 2020; 12 (1):114. DOI: 10.3390/v12010114.
27. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике. Под ред. А. И. Карпищенко. 3-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013; Т. 2: 274–314. Meditsinskie laboratornyye tekhnologii: rukovodstvo po klinicheskoi laboratornoi diagnostike = Medical laboratory techniques: Guidelines for clinical laboratory diagnostics. Ed. by A. I. Karpishchenko. 3rd edition, revised and supplemented. Moscow: GEOTAR-Media; 2013; Vol. 2: 274–314. (in Russ.)
28. Yang Y., Dong M., Hao X., Qin A., Shang S. Revisiting cellular immune response to oncogenic Marek's disease virus: the rising of avian T-cell immunity. *Cell. Mol. Life Sci.* 2020; 77 (16): 3103–3116. DOI: 10.1007/s00018-020-03477-z.
29. Dai M., Xu C., Chen W., Liao M. Progress on chicken T cell immunity to viruses. *Cell. Mol. Life Sci.* 2019; 76 (14): 2779–2788. DOI: 10.1007/s00018-019-03117-1.
30. Liu A. L., Li Y. F., Qi W., Ma X. L., Yu K. X., Huang B., et al. Comparative analysis of selected innate immune-related genes following infection of immortal DF-1 cells with highly pathogenic (H5N1) and low pathogenic (H9N2) avian influenza viruses. *Virus Genes*. 2015; 50 (2): 189–199. DOI: 10.1007/s11262-014-1151-z.

Поступила в редакцию / Received 27.08.2021

Доработана после рецензирования / Revised 08.10.2021

Принята к публикации / Accepted 18.10.2021

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Осипова Ольга Сергеевна, ветеринарный врач референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Волкова Марина Алексеевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Фролов Сергей Владимирович, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Андрейчук Дмитрий Борисович, кандидат биологических наук, заведующий референтной лабораторией вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Чвала Илья Александрович, кандидат ветеринарных наук, заместитель директора по НИР ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Olga S. Osipova, Veterinarian, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Marina A. Volkova, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Sergey V. Frolov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Laboratory for Avian Diseases Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Dmitry B. Andreychuk, Candidate of Science (Biology), Head of Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Ilya A. Chvala, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Deputy Director for Research, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.



Вирус инфекционной бурсальной болезни: выявление новой генетической группы и реассортантов

Л. О. Щербакова¹, Е. В. Овчинникова², Т. Н. Зыбина³, С. Н. Колосов⁴, Н. Г. Зиняков⁵, З. Б. Никонова⁶, Д. Б. Андрейчук⁷, И. А. Чвала⁸

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0001-5434-6179>, e-mail: scherbakova@arriah.ru

² <https://orcid.org/0000-0001-5501-4432>, e-mail: ovchinnikova@arriah.ru

³ <https://orcid.org/0000-0002-9434-6680>, e-mail: zybina@arriah.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-8467-180X>, e-mail: kolosov@arriah.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0002-3015-5594>, e-mail: zinyakov@arriah.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0003-0090-9399>, e-mail: nikonova@arriah.ru

⁷ <https://orcid.org/0000-0002-1681-5795>, e-mail: andreychuk@arriah.ru

⁸ <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>, e-mail: chvala@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты филогенетического анализа изолятов вируса инфекционной бурсальной болезни по нуклеотидным последовательностям фрагментов геномных сегментов А и В. Традиционно изоляты вируса инфекционной бурсальной болезни классифицируют на основе филогенетического анализа гипервариабельной области гена VP2. Анализ фрагмента гена VP2 изолятов, выявленных на территории Российской Федерации, показал, что большинство из них относятся к генетической группе, объединяющей высоковирулентные изоляты вируса инфекционной бурсальной болезни. Но не все изоляты, относящиеся к одной генетической группе, обладают одинаковыми фенотипическими свойствами. Это связано, в частности, с тем, что вирулентность определяется генетическими особенностями не только гена VP2 (сегмент А), но и гена VP1 (сегмент В). Сегментированная природа генома вируса инфекционной бурсальной болезни делает возможным образование реассортантов, которые можно выявить в результате анализа обоих геномных сегментов. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов генов VP2 и VP1 28 изолятов вируса инфекционной бурсальной болезни, выявленных в птицеводческих хозяйствах РФ, Украины и Казахстана в 2007–2019 гг., показал, что 15 из них являются реассортантами. Среди реассортантов выявлены различные комбинации геномных сегментов. Выявление разнообразия комбинаций геномных сегментов вируса инфекционной бурсальной болезни свидетельствует о том, что в птицеводческих хозяйствах циркулирует гетерогенная вирусная популяция. Изучение степени патогенности трех изолятов вируса инфекционной бурсальной болезни показало, что наиболее вирулентным был изолят, имеющий оба геномных сегмента, характерных для высоковирулентного вируса. Два реассортанта, имеющих только по одному геномному сегменту А или В, характерному для высоковирулентного вируса инфекционной бурсальной болезни, обладали менее выраженными вирулентными свойствами.

Ключевые слова: вирус инфекционной бурсальной болезни, филогенетический анализ

Благодарности: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Щербакова Л. О., Овчинникова Е. В., Зыбина Т. Н., Колосов С. Н., Зиняков Н. Г., Никонова З. Б., Андрейчук Д. Б., Чвала И. А. Вирус инфекционной бурсальной болезни: выявление новой генетической группы и реассортантов. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (1): 77–84. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-77-84.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Щербакова Лидия Олеговна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: scherbakova@arriah.ru.

Infectious bursal disease virus: identification of the novel genetic group and reassortant viruses

L. O. Scherbakova¹, Ye. V. Ovchinnikova², T. N. Zyбина³, S. N. Kolosov⁴, N. G. Zinyakov⁵, Z. B. Nikonova⁶, D. B. Andreychuk⁷, I. A. Chvala⁸

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ <https://orcid.org/0000-0001-5434-6179>, e-mail: scherbakova@arriah.ru

² <https://orcid.org/0000-0001-5501-4432>, e-mail: ovchinnikova@arriah.ru

³ <https://orcid.org/0000-0002-9434-6680>, e-mail: zybina@arriah.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-8467-180X>, e-mail: kolosov@arriah.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0002-3015-5594>, e-mail: zinyakov@arriah.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0003-0090-9399>, e-mail: nikonova@arriah.ru

⁷ <https://orcid.org/0000-0002-1681-5795>, e-mail: andreychuk@arriah.ru

⁸ <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>, e-mail: chvala@arriah.ru

SUMMARY

The results of the phylogenetic analysis of the nucleotide sequence of the IBDV A and B genome segments have been presented. Traditionally the IBDV isolates are classified based on the phylogenetic analysis of the hypervariable region of the VP2 gene. The analysis of the VP2 gene segments of the isolates detected in the Russian Federation demonstrated that most of them belong to the genetic group comprising highly virulent IBDV isolates. However, not all isolates belonging to one genetic group have the same phenotypic characteristics. This is related to the fact that the virulence is determined not only based on the characteristics of the VP2 gene (A segment) but on the characteristics of the VP1 gene (B segment) as well. The IBDV genome segmentation allows formation of reassortant viruses which can be identified as a result of the genome segment analysis. The phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of VP2 and VP1 genes of 28 IBDV isolates detected at RF, Ukrainian and Kazakh poultry establishments in 2007 and 2019 showed that 15 of them are reassortant viruses. Different combinations of the genome segments have been identified among these reassortant viruses. Detection of different combinations of IBDV genome segments is indicative of the fact that the heterogeneous virus population circulates on the poultry farms. Pathogenicity studies of the three IBDV isolates showed that the most virulent was an isolate having two genome segments characteristic of the highly virulent virus. Two reassortant viruses having only one genome segment A or B, characteristic of the infectious bursal disease, demonstrated less pronounced virulent properties.

Keywords: infectious bursal disease virus, phylogenetic analysis

Acknowledgements: The study was funded by the FGBI "ARRIAH" within the framework of "Veterinary Welfare" research work.

For citation: Scherbakova L. O., Ovchinnikova Ye. V., Zybina T. N., Kolosov S. N., Zinyakov N. G., Nikonova Z. B., Andreychuk D. B., Chvala I. A. Infectious bursal disease virus: identification of the novel genetic group and reassortant viruses. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (1): 77–84. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-77-84.

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

For correspondence: Lidia O. Scherbakova, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: scherbakova@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус инфекционной бурсальной болезни (ВИББ) является возбудителем острого высококонтагиозного заболевания, широко распространенного в странах с промышленным птицеводством. Вирус ИББ поражает лимфоциты фабрициевой сумки, тимуса, селезенки, пейеровых бляшек кишечника. Последствиями иммуносупрессии, вызванной ВИББ, являются снижение эффективности вакцинации, в том числе против других болезней, а также увеличение восприимчивости цыплят к условно-патогенным микроорганизмам. Высоковирулентный вирус ИББ (ВВ ВИББ) может вызывать повышенную смертность птицы. Высокая контагиозность и устойчивость вируса к действию факторов внешней среды и дезинфектантов, а также значимый экономический ущерб от болезни делает ИББ серьезной проблемой для птицеводства многих стран мира.

Вирус ИББ относится к семейству *Birnaviridae*, роду *Avibirnavirus* [1]. Геном ВИББ представлен двумя сегментами двухцепочечной РНК. Сегмент А содержит две частично перекрывающиеся открытые рамки считывания (ОРС). Меньшая ОРС1 кодирует неструктурный вирусный белок VP5, который способствует высвобождению зрелых вирионов. Более крупная ОРС2 кодирует полипротеин, из которого в результате автопротеолиза образуются предшественники VP2 (pVP2), VP4 и VP3 [2]. Белок VP2 участвует в формировании внешней поверхности вириона. Это главный иммуноген, несущий антигенные сайты, отвечающие за нейтрализацию вируса антителами. Белок VP2 от-

вечает за антигенную изменчивость и вирулентность вируса. Белок VP3 взаимодействует со всеми другими компонентами вириона, поэтому он играет критическую роль в морфогенезе вириона, инкапсидации и репликации вируса. Белок VP4 представляет собой сериновую протеазу, которая играет важную роль в созревании VP2, а также участвует в протеолизе полипротеина. Геномный сегмент В содержит одну ОРС, кодирующую РНК-зависимую РНК-полимеразу VP1, отвечающую за репликацию вирусного генома и синтез мРНК [3, 4].

В настоящее время выявлено 2 серотипа ВИББ. Штаммы ВИББ серотипа 1 классифицируются в зависимости от тяжести вызываемого заболевания на 3 типа: субклинический, классический вирулентный и высоковирулентный [5]. Вирус серотипа 2 выделен у индеек и авирулентен для цыплят.

Традиционно изоляты ВИББ классифицируют на основе филогенетического анализа фрагмента гена VP2, включающего гипервариабельную область. Классификация, предложенная Т. Р. Van den Berg et al. [6], подразделяет штаммы серотипа 1 на генотипы: аттенуированные, классические вирулентные, высоковирулентные, антигенные варианты и австралийские.

Высоковирулентный ВИББ впервые был обнаружен у бройлеров в Европе в конце 1980-х гг. [7] и быстро распространился в Африке, Азии и Латинской Америке, вызывая высокую заболеваемость и смертность более 30% [8]. Антигенные варианты стали преобладающими на Американском континенте. Они обычно вызывают субклиническую инфекцию, характеризу-

ющуюся быстрой атрофией фабрициевой сумки без значительного воспаления, что может привести к иммуносупрессии. В 2019 г. появилось сообщение о выявлении в Китае нового, отличающегося от американских вариантов, антигенного варианта ВИББ, который вызывал сильную иммунодепрессию у цыплят [9].

Антигенный фенотип ВИББ определяется гипервариабельной областью VP2, в частности, аминокислотами, расположенными на вершине петлевых структур, обозначенных PBC, PDE, PFG и PHI [10]. Установлено, что даже точечные мутации в этих областях могут привести к антигенному дрейфу ВИББ [10, 11] и сделать вакцинацию против ИББ неэффективной.

Michel L. O. and Jackwood D. J. [12] предложили использовать новую классификацию ВИББ, разделив идентифицированные штаммы вируса на 7 геногрупп. Большинство ВИББ формируют 3 геногруппы: 1 – классическая, 2 – вариантная и 3 – ВВ ВИББ или реассортантные ВИББ. Оставшиеся 4 геногруппы включают ВИББ, выявленные в разных регионах мира.

Изоляты ВИББ, принадлежащие к одной из геногрупп, имеют ряд общих генотипических и фенотипических свойств. Но не всегда все изоляты, относящиеся к одной и той же геногруппе, обладают одинаковыми фенотипическими свойствами. Это связано, в частности, с тем, что вирулентность определяется генетическими различиями не только в гене VP2, но и в гене VP1 [13–15].

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена VP1 показывает, что все штаммы ВИББ делятся на две большие генетические группы: одна из них содержит ВВ ВИББ, в другую входят все остальные геногруппы ВИББ [16].

Сегментированная природа генома ВИББ делает возможным образование реассортантов в случае коинфицирования клетки хозяина разными штаммами вируса. Были опубликованы работы о выявлении реассортации между штаммами серотипа 1 [17–22]. Реассортантные вирусы, у которых сегмент А характерен для ВВ ВИББ, а сегмент В относится к другой, не высоковирулентной группе, часто имеют патогенность ниже, чем у ВВ родительских штаммов [23]. С другой стороны, в Польше был выявлен реассортант Врор/03, который имел сегмент А, происходящий от ВВ ВИББ, а сегмент В – от классического аттенуированного штамма D78 [24]. Несмотря на мозаичный генетический состав, вирус вызвал высокую смертность (80%) у экспериментально инфицированных SPF-цыплят и поражения, типичные для острой формы ИББ. Эти данные противоречат предыдущим экспериментальным исследованиям, в которых естественные реассортанты демонстрировали промежуточный патотип [23].

Анализ фрагмента гена VP2 изолятов ВИББ, выявленных на территории Российской Федерации в период с 1993 по 2020 г., показал, что большинство из них относятся к группе ВВ ВИББ. Анализ двух геномных сегментов является более информативным и позволяет выявлять реассортанты вируса. В данной работе приведены молекулярные характеристики изолятов ВИББ, выявленных в 2007–2019 гг., на основе выравнивания нуклеотидных последовательностей гипервариабельной области гена VP2 (сегмент А) и фрагмента гена VP1, несущего филогенетический маркер (сегмент В).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы 26 изолятов ВИББ, выявленных в пробах патологического материала, полученных из птицеводческих хозяйств РФ, а также 2 изолята ВИББ – с Украины и из Казахстана (табл. 1).

Выделение РНК. Суммарную РНК выделяли из осветленной суспензии, приготовленной из фабрициевых сумок кур, с использованием коммерческого набора SV 96 Total RNA Isolation System (Promega, США).

Полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) проводили в одну стадию. Для постановки реакции использовали обратную транскриптазу

Таблица 1
Изоляты вируса инфекционной бурсальной болезни

Table 1
IBDV isolates

№	Дата получения проб	Регион отбора проб	Название изолята
1	25.06.2007	Красноярский край	IBDVRF02-2007
2	11.10.2007	Республика Дагестан	IBDVRF03-2007
3	29.10.2007	Украина	IBDVUkr04-2007
4	12.11.2007	Приморский край	IBDVRF05-2007
5	04.06.2014	Новгородская область	IBDVRF02-2014
6	28.07.2014	Республика Казахстан	IBDVkaz03-2014
7	11.08.2014	Республика Татарстан	IBDVRF04-2014
8	16.10.2014	Оренбургская область	IBDVRF05-2014
9	08.04.2015	Владимирская область	IBDVRF02-2015
10	11.10.2015	Ярославская область	IBDVRF06-2015
11	27.10.2016	Новгородская область	IBDVRF02-2016
12	09.11.2016	Челябинская область	IBDVRF03-2016
13	04.04.2017	Новгородская область	IBDVRF01-2017
14	02.08.2017	Чувашская Республика	IBDVRF02-2017
15	05.10.2017	Курская область	IBDVRF03-2017
16	24.11.2017	Кировская область	IBDVRF06-2017
17	28.11.2017	Республика Марий Эл	IBDVRF08-2017
18	21.08.2018	Ленинградская область	IBDVRF01-2018
19	03.08.2018	Курская область	IBDVRF02-2018
20	16.01.2019	Новгородская область	IBDVRF01-2019
21	16.01.2019	Новгородская область	IBDVRF02-2019
22	27.02.2019	Свердловская область	IBDVRF03-2019
23	07.03.2019	Ленинградская область	IBDVRF04-2019
24	06.05.2019	Ивановская область	IBDVRF05-2019
25	06.06.2019	Новгородская область	IBDVRF06-2019
26	24.06.2019	Владимирская область	IBDVRF07-2019
27	02.07.2019	Владимирская область	IBDVRF09-2019
28	18.10.2019	Ярославская область	IBDVRF10-2019

вируса миелобластога птиц (AMV-RT) и Taq-ДНК-полимеразу (Promega, США) в соответствии с инструкцией производителя. Для расчета праймеров были использованы консервативные области VP1 и VP2. Реакционная смесь для ОТ-ПЦР в конечном объеме 25 мкл содержала: 10 мкл деионизованной воды; 5 мкл 5x буфера для ОТ-ПЦР; 2 мкл 25 мМ раствора MgCl₂; 1 мкл раствора дНТФ 10 мМ; по 1 мкл раствора прямого и обратного праймеров в концентрации 10 пмоль/мкл; 0,13 мкл обратной транскриптазы и 0,25 мкл полимеразы; 5 мкл раствора суммарной РНК. Обратную транскрипцию проводили в течение 30 мин при 50 °С. Для амплификации применяли следующие температурно-временные параметры: 95 °С – 10 мин (активация полимеразы), далее 40 циклов, каждый из которых состоял из трех шагов: 95 °С – 50 сек., 55 °С – 50 сек., 72 °С – 60 сек. Для увеличения чувствительности использовали nested-ПЦР с внутренней парой праймеров. Для визуализации результатов реакции использовали электрофорез в 2%-м агарозном геле с бромистым этидием.

Выравнивание нуклеотидных последовательностей и филогенетический анализ. Очищенные ПЦР-продукты использовали для определения нуклеотидных последовательностей фрагментов генов VP1 и VP2, которое осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI Prism® 3100 (США) с помощью наборов BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя.

Для анализа использовали нуклеотидные последовательности изолятов и штаммов ВИББ, опубликованные в базе данных GenBank электронного ресурса NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) (табл. 2). Анализ нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit, версия 7.0.5.3. Выравнивание последовательностей осуществляли с помощью программы множественного выравнивания ClustalW. Построение филогенетического дерева проводили

с помощью алгоритма UPGMA в реализации пакета MEGA, версия 6.06.

Сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей с базой данных последовательностей и вычисление статистической значимости осуществляли с использованием программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Были определены нуклеотидные последовательности фрагментов генов VP2 и VP1 для 28 изолятов ВИББ, выявленных в птицеводческих хозяйствах РФ, Украины и Казахстана в период с 2007 по 2019 г. Для сравнительного анализа использовали опубликованные нуклеотидные последовательности штаммов ВИББ, относящиеся к разным генотипам по классификации L. O. Michel and D. J. Jackwood [12] (табл. 2).

Филогенетический анализ фрагмента гена VP2.

В результате сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена VP2 изолятов ВИББ было установлено, что 22 изолята относятся к генотипу 3 (ВВ ВИББ), изолят IBDVRF07-2019 – к генотипу 1, 2 изолята IBDVRF03-2017 и IBDVRF02-2018 являются вариантами, 3 изолята IBDVRF05-2014, IBDVRF03-2016 и IBDVRF03-2019 отличаются от всех изолятов более чем на 5% и формируют новую генотипу 8 (рис.).

Генотипу 3 включает ВВ ВИББ и является наиболее многочисленной. Принадлежащие к этой генотипу штаммы ВИББ были выявлены во время острых вспышек инфекционной бурсальной болезни в птицеводческих хозяйствах во всем мире. В последние годы значительно возросло количество опубликованных нуклеотидных последовательностей гена VP2 штаммов, относящихся к генотипу 3.

Анализ последовательностей показывает, что в гипервариабельной области VP2 накапливаются мутации внутри группы, что позволяет выделять в ней подгруппы 3-1, 3-2, 3-3 [12]. Относящиеся к этим под-

Таблица 2

Нуклеотидные последовательности штаммов вируса инфекционной бурсальной болезни, использованные для анализа

Table 2
Nucleotide sequences of the IBDV isolates used for analysis

№	Штамм	Номер в GenBank VP2	Номер в GenBank VP1	Страна	Генотип
1	D78	AF499929	EU162090	Люксембург	1
2	228E	AF457104	AJ878657	Нидерланды	1
3	52/70	HG974565	HG974566	Великобритания	1
4	STC	D00499	JQ619639	США	1
5	Variant E	AF133904	AF133905	США	2
6	UK661	X92760	X92761	Великобритания	3
7	624Russia	MF142552	MF142481	Россия	3-2
8	593Russia	MF142550	MF142479	Россия	3-3
9	MG4	JN982252	–	Бразилия	4
10	Mexico04M101	DQ916210	–	Мексика	5
11	ITA-02	JN852986	–	Италия	6
12	002-73	AJ878908	AJ878639	Австралия	7

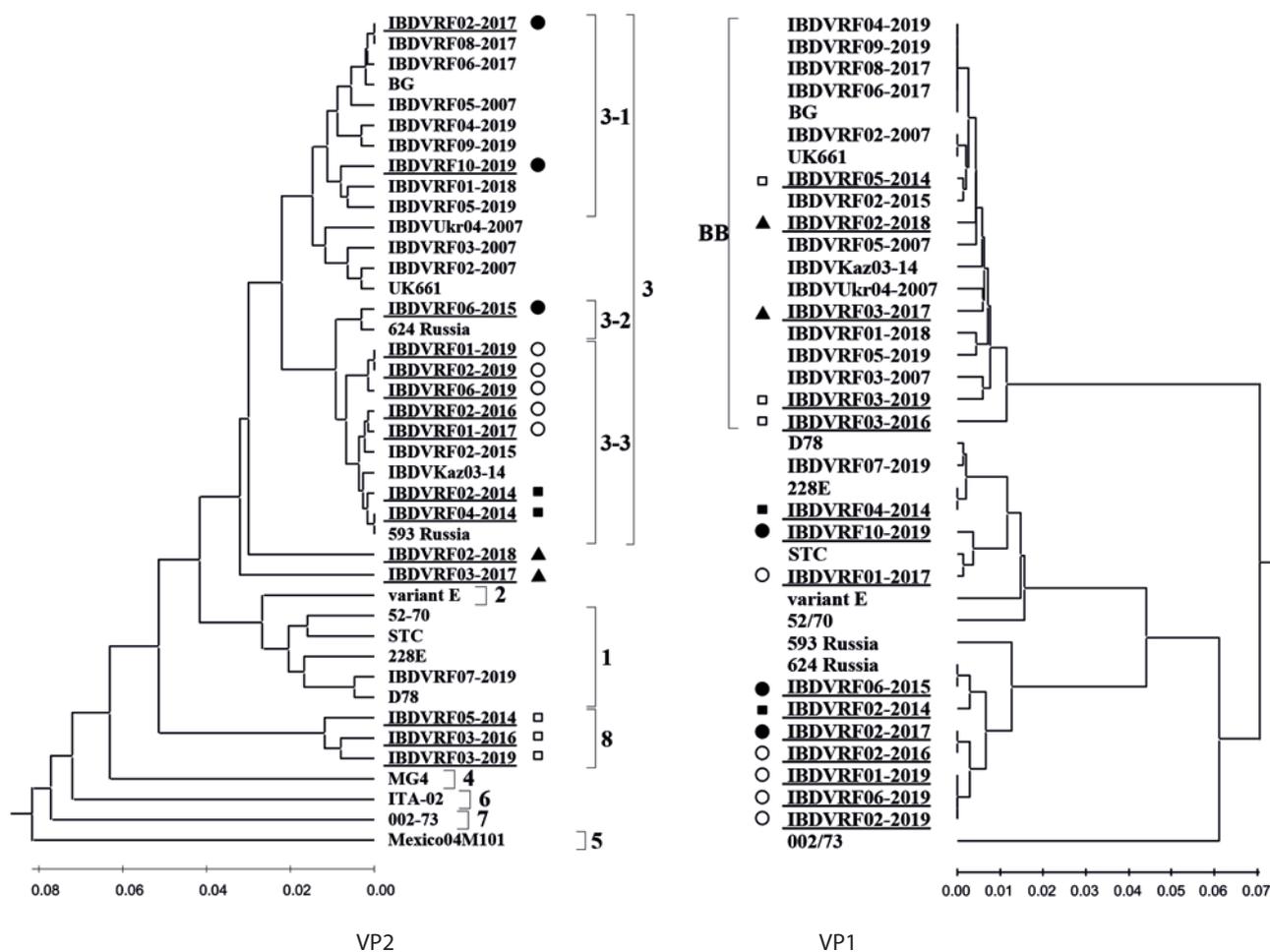


Рис. Филогенетические деревья, построенные на основе выравнивания нуклеотидных последовательностей гиперварибельной области гена VP2 и фрагмента гена VP1. Цифрами указаны генотипы, подчеркиванием и геометрическими фигурами обозначены реассортантные изоляты

Fig. Phylogenetic trees built on the basis of the alignment of the nucleotide sequences of the VP2 gene hypervariable region and VP1 gene segment. Numerals represent genotypes, underlining and geometric figures represent reassortant isolates.

группам изоляты имеют отличия в аминокислотном составе в позициях 212, 222, 254, входящих в состав петлевых структур) и отвечающих за антигенные свойства ВИББ (табл. 3).

Изолят IBDVRF07-2019, принадлежащий к геногруппе 1, является дериватом вакцинного штамма D78. Нуклеотидные последовательности фрагментов генов VP1 и VP2 этого изолята имеют 99,36% гомологии со штаммом D78. Атенуированная вакцина на основе данного штамма широко используется в птицеводческих хозяйствах РФ более 20 лет.

Два вариантных изолята IBDVRF03-2017 и IBDVRF02-2018 были выявлены в пробах, полученных из одного птицеводческого хозяйства Курской области. Нуклеотидные последовательности гена VP2 этих изолятов отличаются друг от друга и от изолятов других геногрупп.

Три изолята IBDVRF05-2014, IBDVRF03-2016, IBDVRF03-2019, выявленные в Оренбургской, Челябинской и Свердловской областях, отличаются от всех исследованных и опубликованных штаммов и, по-видимому, формируют новую геногруппу 8. Нукле-

отидные последовательности гена VP2 штаммов и изолятов ВИББ, содержащиеся в GenBank, отличались от последовательностей данной группы изолятов более чем на 5%. Изоляты геногруппы 8 имеют в гиперварибельной области VP2 (табл. 3) аминокислотные остатки, характерные для ВВ ВИББ (242I, 256I, 294I, 299S), а также ряд собственных только для них аминокислотных остатков: 213E, 220F, 222V, 269S, 280T, 317R, 324P. Стоит отметить, что изменение аминокислоты в положении 222 имеет важное значение, поскольку этот остаток расположен в петле РВС. Считается, что переход от Pro к Thr в позиции 222 сыграл существенную роль в значительном изменении антигенных свойств вариантных штаммов ВИББ в 1980-х гг. [25], что привело к неэффективности вакцинации.

Филогенетический анализ фрагмента гена VP1.

В результате анализа опубликованных нуклеотидных последовательностей гена VP1 штаммы ВИББ делятся на 2 большие группы. Первая включает ВВ ВИББ, вторая – все остальные генетические группы: аттенуированные, классические вариантные, антигенные и австралийские варианты, а также серотип 2 [26].

Таблица 3

Отличия аминокислотных последовательностей в гипервариабельной области VP2 и маркерной последовательности VP1

Table 3

Difference between the amino acid sequences in the hypervariable VP2 region and VP1 marker sequence

Штамм/изолят	Геногруппа	VP2													VP1
		212	213	220	222	242	254	256	269	280	294	299	317	324	145-146-147
228E	1	D	D	Y	S	V	G	I	T	N	L	N	S	Q	NEG
D78	1	D	D	Y	P	V	G	V	T	N	L	N	S	Q	NEG
52-70	1	D	D	Y	P	I	G	V	T	N	L	N	S	Q	NEG
STC	1	D	D	Y	P	V	G	V	T	N	L	N	S	Q	NED
Variant E	2	D	N	Y	T	V	S	V	T	N	L	N	S	E	NEG
UK661	3	D	D	Y	A	I	G	I	T	N	I	S	S	Q	TDN
IBDVRF02-2017	3-1	D	D	Y	A	I	G	I	T	N	I	S	S	Q	NEG
IBDVRF06-2015	3-2	N	D	Y	T	I	D	I	T	N	I	S	S	Q	NEG
IBDVRF02-2016	3-3	N	D	Y	A	I	D	I	T	N	I	S	S	Q	NEG
IBDVRF04-2014	3-3	N	D	Y	A	I	D	I	T	N	I	S	S	Q	NEG
MG4	4	–	D	Y	S	V	S	V	T	T	L	N	S	Q	–
Mexico04M101	5	–	N	Y	T	V	N	V	T	N	L	N	K	Q	–
ITA-02	6	–	-	H	Q	V	S	K	S	N	L	S	S	Q	–
002-73	7	D	D	Y	P	V	G	V	T	N	L	S	S	Q	TES
IBDVRF05-2014	8	D	E	F	V	I	D	I	S	T	I	S	R	P	TDN
IBDVRF03-2017	Вариантный изолят	D	D	Y	T	I	D	I	T	N	I	S	R	Q	TDS
IBDVRF02-2018	Вариантный изолят	N	D	Y	A	I	D	I	T	N	I	S	S	Q	TDN

Было определено, что в VP1 в позициях 145/146/147 находится характерный для ВВ ВИББ маркерный триплет TDN [27, 28]. Среди ВВ ВИББ наблюдали низкую вариабельность этого триплета в VP1.

Филогенетический анализ фрагмента гена VP1 исследованных нами изолятов ВИББ показал, что они также разделяются на 2 группы: в группу с ВВ ВИББ-подобным сегментом вошли 17 изолятов, а в группу с не-ВВ ВИББ-подобным сегментом В – 11 изолятов. В первой группе, за исключением изолята IBDVRF03-2017, последовательность VP1 несет характерную для ВВ ВИББ маркерную последовательность TDN (табл. 3).

Филогенетический анализ фрагмента гена VP1 показывает, что группа с не-ВВ ВИББ-подобным сегментом делится на две подгруппы. Первая включает аттенуированные штаммы, классические вирулентные и антигенные варианты, и в нее входят 4 исследованных изолята: IBDVRF07-2019, IBDVRF04-2014, IBDVRF10-2019, IBDVRF01-2017. Вторая подгруппа состоит из 4 изолятов (IBDVRF02-2014, IBDVRF02-2016, IBDVRF01-2019, IBDVRF06-2019), выявленных в одном птицеводческом хозяйстве Новгородской области, и трех изолятов (IBDVRF02-2017, IBDVRF06-2015, IBDVRF02-2019), полученных из Чувашии, Ярославской и Новгородской областей. В эту же подгруппу также попадают изоляты 593 Russia и 624 Russia, выявленные в РФ. Интересен источник происхождения изолятов ВИББ, входящих в эту эндемичную

подгруппу, поскольку она включает изоляты, обнаруженные исключительно на территории РФ. Сравнение с опубликованными последовательностями VP1 показало, что нуклеотидные последовательности гена VP1 этих изолятов ВИББ отличались от всех остальных изолятов и штаммов более чем на 6%. Все изоляты в этой подгруппе имеют маркерный триплет NEG.

Выявление реассортантов. Десять изолятов, у которых ген VP2 относится к ВВ ВИББ (геногруппа 3), являются реассортантами. Кроме того, изоляты геногруппы 8 также являются реассортантами. Филогенетическое положение, полученное при анализе гена VP1, указывает, что все три изолята входят в группу ВВ ВИББ. Два вариантных изолята имеют VP1, также относящийся к ВВ ВИББ. Таким образом, 15 из 28 исследованных изолятов ВИББ являются реассортантами.

Среди изолятов, не относящихся по структуре гена VP1 к ВВ ВИББ, только изолят IBDVRF07-2019 (геногруппа 1) не является реассортантом и имеет 99,36% гомологии с вакцинным штаммом D78 в обоих генах.

Изолят IBDVRF04-2014 (подгруппа 3-3) имеет 100%-ю гомологию с вакцинным штаммом 228E по фрагменту гена VP1. Получение такого реассортанта можно объяснить использованием вакцины на основе штамма 228E.

Необычную группу реассортантов выявляли в птицеводческом хозяйстве Новгородской области в те-

чение 6 лет. По структуре фрагмента гена VP2 они являются близкородственными (имеют 99%-ю гомологию) и относятся к подгруппе 3-3. По структуре гена VP1, за исключением IBDVRF01-2017, они входят в эндемичную подгруппу. Фрагмент гена VP1 изолята IBDVRF01-2017 из Новгородской области имеет высокую степень гомологии со штаммом STC. Происхождение сегмента В данного изолята от вируса другой генетической подгруппы свидетельствует о том, что в данном птицеводческом хозяйстве существует гетерогенная вирусная популяция, включающая ВИББ из разных генетических групп.

Было показано, что в птицеводческих хозяйствах возможна длительная циркуляция определенных генетических форм ВИББ. С другой стороны, происходит смена изолятов вируса. Так, в одном из птицеводств Курской области в течение 2 лет были выявлены варианты изоляты IBDVRF03-2017, IBDVRF02-2018, отличающиеся друг от друга по нуклеотидной последовательности гипервариабельной области гена VP2 на 4,7%. По структуре фрагмента гена VP1 оба изолята относятся к ВВ ВИББ и отличаются друг от друга на 1,8%.

Два отличающихся изолята IBDVRF06-2015 (геногруппа 3-2) и IBDVRF10-2019 (геногруппа 3-1) были выявлены в птицеводческом хозяйстве Ярославской области. Оба они являются реассортантами. Ген VP1 этих изолятов относится к разным генетическим подгруппам: IBDVRF06-2015 относится к эндемичной подгруппе, а IBDVRF10-2019 имеет близкое родство со штаммом STC.

Ранее была изучена степень патогенного действия трех изолятов ВИББ [29]. В исследовании были использованы изолят IBDVRF08-2017, имеющий гены VP1 и VP2, относящиеся к ВВ ВИББ, и два реассортанта: IBDVRF06-2019 – характеризующийся ВВ VP2 и не-ВВ VP1; IBDVRF03-2017 – с вариантным VP2 и ВВ VP1. Установлено, что по отношению к контрольному штамму 52-70 наибольшую оценку вирулентности имел изолят IBDVRF08-17 (80,5%). Наименее вирулентными оказались изоляты IBDVRF06-19 (44,3%) и IBDVRF03-17 (43,9%).

Таким образом, наибольшую вирулентность показал изолят, оба геномных сегмента которого относились к ВВ ВИББ. В то время как реассортанты, имеющие только один сегмент, относящийся к ВВ ВИББ, проявляли меньшую степень патогенности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе анализа гипервариабельной области гена VP2 большинство (22 из 28) исследованных изолятов ВИББ относятся к геногруппе 3 (ВВ ВИББ). Три изолята, выявленные в географически близких регионах, формируют новую геногруппу 8. Два изолята, обнаруженные в птицеводческом хозяйстве Курской области в 2017 и 2018 гг., являются вариантами. Один изолят представляет собой дериват вакцинного штамма D78.

Только часть изолятов 3-й группы обладает VP1, относящимся к ВВ ВИББ. С другой стороны, варианты изоляты и изоляты новой геногруппы 8 имеют VP1, характерный для ВВ ВИББ. Из 28 исследованных изолятов 15 являются реассортантами. Среди реассортантов выявлены различные комбинации геномных сегментов (сегмент В – сегмент А): ВВ – эндемичные, ВВ – классические вирулентные, ВВ – аттенуированные штаммы, варианты – ВВ, геногруппа 8 – ВВ. Выявление разнообразия комбинаций геномных сегментов ВИББ сви-

детельствует о том, что в птицеводческих хозяйствах циркулирует гетерогенная вирусная популяция.

Изучение степени патогенности изолятов ВИББ показало, что реассортантные вирусы менее патогенны, чем ВВ ВИББ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Delmas B., Kibenge F. S. B., Leong J. C., Mundt E., Vakharia V. N., Wu J. L. Family *Birnaviridae*. In: *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed. by C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L. A. Ball. London: Academic Press; 2004; 561–569.
- Kibenge F. S., Dhillon A. S., Russell R. G. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.* 1988; 69 (Pt 8): 1757–1775. DOI: 10.1099/0022-1317-69-8-1757.
- Macreadie I. G., Azad A. A. Expression and RNA dependent RNA polymerase activity of birnavirus VP1 protein bacteria and yeast. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1993; 30 (6): 1169–1178. PMID: 8220261.
- Qin Y., Zheng S. J. Infectious bursal disease virus-host interactions: Multifunctional viral proteins that perform multiple and differing jobs. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18 (1):161. DOI: 10.3390/ijms18010161.
- Jackwood D. J., Schat K. A., Michel L. O., de Wit S. A proposed nomenclature for infectious bursal disease virus isolates. *Avian Pathol.* 2018; 47 (6): 576–584. DOI: 10.1080/03079457.2018.1506092.
- Van den Berg T. P., Etteradossi N., Toquin D., Meulemans G. Infectious bursal disease (Gumboro disease). *Rev. Sci. Tech.* 2000; 19 (2): 509–543. DOI: 10.20506/rst.19.2.1227.
- Stuart J. C. Acute infectious bursal disease in poultry. *Vet. Rec.* 1989; 125 (10):281. DOI: 10.1136/vr.125.10.281-a.
- Etteradossi N., Saif Y. M. Infectious bursal disease. In: *Diseases of Poultry*. Eds. D. E. Swayne, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, D. L. Suarez, V. L. Nair. 13th ed. Wiley-Blackwell; 2013; 219–246.
- Fan L., Wu T., Hussain A., Gao Y., Zeng X., Wang Y., et al. Novel variant strains of infectious bursal disease virus isolated in China. *Vet. Microbiol.* 2019; 230: 212–220. DOI: 10.1016/j.vetmic.2019.01.023.
- Letzel T., Coulibaly F., Rey F. A., Delmas B., Jagt E., van Loon A. A., Mundt E. Molecular and structural bases for the antigenicity of VP2 of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 2007; 81 (23): 12827–12835. DOI: 10.1128/JVI.01501-07.
- Jackwood D. J., Sommer-Wagner S. E. Amino acids contributing to antigenic drift in the infectious bursal disease birnavirus (IBDV). *Virology.* 2011; 409 (1): 33–37. DOI: 10.1016/j.virol.2010.09.030.
- Michel L. O., Jackwood D. J. Classification of infectious bursal disease virus into genogroups. *Arch. Virol.* 2017; 162 (12): 3661–3670. DOI: 10.1007/s00705-017-3500-4.
- Liu M., Vakharia V. N. VP1 protein of infectious bursal disease virus modulates the virulence in vivo. *Virology.* 2004; 330 (1): 62–73. DOI: 10.1016/j.virol.2004.09.009.
- Boot H. J., Hoekman A. J., Gielkens A. L. The enhanced virulence of very virulent infectious bursal disease virus is partly determined by its B-segment. *Arch. Virol.* 2005; 150 (1): 137–144. DOI: 10.1007/s00705-004-0405-9.
- Escaffre O., Le Nouën C., Amelot M., Ambroggio X., Ogen K. M., Guionie O., et al. Both genome segments contribute to the pathogenicity of very virulent infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 2013; 87 (5): 2767–2780. DOI: 10.1128/JVI.02360-12.
- Le Nouën C., Rivallan G., Toquin D., Etteradossi N. Significance of the genetic relationships deduced from partial nucleotide sequencing of infectious bursal disease virus genome segments A or B. *Arch. Virol.* 2005; 150 (2): 313–325. DOI: 10.1007/s00705-004-0409-5.
- Brown M. D., Skinner M. A. Coding sequences of both genome segments of a European 'very virulent' infectious bursal disease virus. *Virus Res.* 1996; 40 (1): 1–15. DOI: 10.1016/0168-1702(95)01253-2.
- Yamaguchi T., Ogawa M., Miyoshi M., Inoshima Y., Fukushi H., Hirai K. Sequence and phylogenetic analyses of highly virulent infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* 1997; 142 (7): 1441–1458. DOI: 10.1007/s007050050171.
- Sun J. H., Lu P., Yan Y. X., Hua X. G., Jiang J., Zhao Y. Sequence and analysis of genomic segment A and B of very virulent infectious bursal disease virus isolated from China. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* 2003; 50 (3): 148–154. DOI: 10.1046/j.1439-0450.2003.00646.x.
- Kong L. L., Omar A. R., Hair-Bejo M., Aini I., Seow H. F. Sequence analysis of both genome segments of two very virulent infectious bursal disease virus field isolates with distinct pathogenicity. *Arch. Virol.* 2004; 149 (2): 425–434. DOI: 10.1007/s00705-003-0206-6.
- Cui P., Ma S. J., Zhang Y. G., Li X. S., Gao X. Y., Cui B. A., Chen H. Y. Genomic sequence analysis of a new reassortant infectious bursal disease virus from commercial broiler flocks in Central China. *Arch. Virol.* 2013; 158 (9): 1973–1978. DOI: 10.1007/s00705-013-1682-y.

22. Kasanga C. J., Yamaguchi T., Munang'andu H. M., Ohya K., Fukushi H. Genomic sequence of an infectious bursal disease virus isolate from Zambia: classical attenuated segment B reassortment in nature with existing very virulent segment A. *Arch. Virol.* 2013; 158 (3): 685–689. DOI: 10.1007/s00705-012-1531-4.
23. Wei Y., Yu X., Zheng J., Chu W., Xu H., Yu X., Yu L. Reassortant infectious bursal disease virus isolated in China. *Virus Res.* 2008; 131 (2): 279–282. DOI: 10.1016/j.virusres.2007.08.013.
24. Piłkuła A., Lisowska A., Jasik A., Śmietanka K. Identification and assessment of virulence of a natural reassortant of infectious bursal disease virus. *Vet. Res.* 2018; 49 (1):89. DOI: 10.1186/s13567-018-0586-y.
25. Brown M. D., Green P., Skinner M. A. VP2 sequences of recent European 'very virulent' isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of 'classical' strains. *J. Gen. Virol.* 1994; 75 (Pt 3): 675–680. DOI: 10.1099/0022-1317-75-3-675.
26. Islam M. R., Zierenberg K., Müller H. The genome segment B encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein VP1 of very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) is phylogenetically distinct from that of all other IBDV strains. *Arch. Virol.* 2001; 146 (12): 2481–2492. DOI: 10.1007/s007050170018.
27. Gao L., Li K., Qi X., Gao H., Gao Y., Qin L., et al. Triplet amino acids located at positions 145/146/147 of the RNA polymerase of very virulent infectious bursal disease virus contribute to viral virulence. *J. Gen. Virol.* 2014; 95 (Pt 4): 888–897. DOI: 10.1099/vir.0.060194-0.
28. Alfonso-Morales A., Rios L., Martínez-Pérez O., Dolz R., Valle R., Perera C. L., et al. Evaluation of a phylogenetic marker based on genomic segment B of infectious bursal disease virus: facilitating a feasible incorporation of this segment to the molecular epidemiology studies for this viral agent. *PLoS One.* 2015; 10 (5):e0125853. DOI: 10.1371/journal.pone.0125853.
29. Зыбина Т. Н., Пяткина А. А., Мороз Н. В., Кулаков В. Ю., Щербакова Л. О. Биологические свойства изолятов вируса инфекционной бурсальной болезни, выделенных на территории РФ в период 2017–2019 гг. *Ветеринарная патология.* 2020; (3): 22–29. DOI: 10.25690/VET-PAT.2020.46.82.007.
- Zybina T. N., Pyatkina A. A., Moroz N. V., Kulakov V. Yu., Shcherbakova L. O. Biological properties of the infectious bursal disease virus isolates identified in Russian Federation in 2017–2019. *Veterinarnaya patologiya.* 2020; (3): 22–29. DOI: 10.25690/VETPAT.2020.46.82.007. (in Russ.)

Поступила в редакцию / Received 25.10.2021

Доработана после рецензирования / Revised 01.11.2021

Принята к публикации / Accepted 02.12.2021

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Щербакова Лидия Олеговна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Овчинникова Евгения Валерьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Зыбина Татьяна Николаевна, кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник лаборатории профилактики болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Колосов Сергей Николаевич, кандидат биологических наук, сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Зиняков Николай Геннадьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Никонова Зоя Борисовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Андрейчук Дмитрий Борисович, кандидат биологических наук, заведующий референтной лабораторией вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Чвала Илья Александрович, кандидат ветеринарных наук, заместитель директора по НИР ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Lidia O. Scherbakova, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Yevgeniya V. Ovchinnikova, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Tatyana N. Zybina, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Junior Researcher, Laboratory for Avian Diseases Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Sergey N. Kolosov, Candidate of Science (Biology), Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Nikolay G. Zinyakov, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Zoya B. Nikonova, Candidate of Science (Biology), Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Dmitry B. Andreychuk, Candidate of Science (Biology), Head of Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Ilya A. Chvala, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Deputy Director for Research, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.



Актуальные аспекты обеспечения биологической безопасности при сжигании биологических отходов животного происхождения в Российской Федерации

А. В. Бельчихина¹, М. А. Шibaев², А. М. Селянин³, А. К. Караулов⁴

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0003-1442-2469>, e-mail: belchihina@arriah.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-9382-0109>, e-mail: shibaev@arriah.ru

³ <https://orcid.org/0000-0003-1200-4597>, e-mail: selyanin@arriah.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-5731-5762>, e-mail: karaulov@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В процессе содержания и разведения животных, а также при производстве, транспортировке, заготовке, переработке продуктов и сырья животного происхождения образуется значительное количество биологических отходов, которые являются источником загрязнения окружающей среды и создают реальную угрозу здоровью человека и животных. Установки по сжиганию биологических отходов животного происхождения являются объектами повышенной опасности и требуют постоянного наблюдения и надзора. Для объективного отражения реальной ситуации с объектами сжигания биологических отходов в субъектах Российской Федерации и формирования целостного представления о рассматриваемой проблеме в стране был проведен сбор информации и проанализированы данные, предоставленные органами исполнительной власти субъектов Российской Федерации в области ветеринарии. Рассмотрены такие показатели, как количество, вид (стационарные, мобильные), форма собственности, расположение, наличие сертификата и квалифицированных специалистов, обслуживающих установки для сжигания биологических отходов животного происхождения, а также обеспеченность субъектов Российской Федерации данными объектами по состоянию на 1 января 2021 г. Анализ полученных первичных данных показал, что в стране зарегистрировано 4459 объектов сжигания биологических отходов животного происхождения, основная часть которых составляет стационарные установки, находящиеся в ведении предприятий, занятых содержанием сельскохозяйственных животных, а также переработкой, производством и хранением животноводческой продукции. В большинстве случаев обслуживание данных объектов осуществляет неквалифицированный персонал, который не владеет знаниями о технических характеристиках и принципах работы используемых установок. Почти треть установок по сжиганию биологических отходов животного происхождения в стране непромышленного изготовления, поэтому их использование не гарантирует полного сгорания биологических отходов и инактивации патогенов. Также выявлено, что в стране законодательно не закреплён порядок проведения сжигания биологических отходов животного происхождения в трупосжигательных печах. Полученные результаты исследования свидетельствуют о том, что в Российской Федерации сложилась напряжённая ситуация в сфере сжигания биологических отходов животного происхождения.

Ключевые слова: утилизация, уничтожение, биологические отходы животного происхождения, объекты по сжиганию биологических отходов животного происхождения, трупосжигательные печи, крематоры, инсинераторы

Благодарности: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Бельчихина А. В., Шibaев М. А., Селянин А. М., Караулов А. К. Актуальные аспекты обеспечения биологической безопасности при сжигании биологических отходов животного происхождения в Российской Федерации. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (1): 85–92. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-85-92.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Бельчихина Анастасия Владимировна, младший научный сотрудник информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: belchihina@arriah.ru.

Contemporary issues in ensuring biological safety during disposal of biological wastes of animal origin by incineration in the Russian Federation

A. V. Belchikhina¹, M. A. Shibayev², A. M. Selyanin³, A. K. Karaulov⁴

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ <https://orcid.org/0000-0003-1442-2469>, e-mail: belchihina@arriah.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-9382-0109>, e-mail: shibaev@arriah.ru

³ <https://orcid.org/0000-0003-1200-4597>, e-mail: selyanin@arriah.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-5731-5762>, e-mail: karaulov@arriah.ru

SUMMARY

Animal management and breeding as well production, transportation, preparation, and processing of animal products and raw material result in generation of a considerable amount of biological wastes being a source of biological contamination of the environment and a clear threat to human and animal health. The animal biowaste incineration units are high threat facilities and require constant surveillance and control. Collection and analysis of data provided by the RF veterinary executive authorities were performed to objectively reflect the actual situation of the biological waste incineration facilities in the RF Subjects and to create a holistic view on the problem of interest in the country. The following parameters were analyzed: their number, type (stationary and mobile), type of ownership, location, availability of the certificate and highly-qualified specialists serving the biological waste incineration equipment as well as the availability of such facilities in the RF Subjects as for January 1, 2021. The analysis demonstrated that 4,459 biowaste incinerators were registered in the country. Most of these units are stationary and they belong to establishments involved in farm animal keeping, animal product processing, production and storing. Such equipment is mostly serviced by non-qualified staff ignorant of the technical characteristics and operating principles of this equipment. Almost one third of these units in the country are home made that is why their use does not guarantee complete destruction of biological wastes and pathogen inactivation. It was also revealed that the procedure for the incineration of biological waste of animal origin using home made incinerators is not legally fixed in the country. The results obtained show that the situation of the animal biowaste incineration in the Russian Federation is quite complicated.

Keywords: disposal, destruction, biological wastes of animal origin, animal biowaste incinerators, home made incinerator, cremating furnace, incinerators

Acknowledgements: The study was funded by the FGBl "ARRIAH" within the framework of "Veterinary Welfare" research work.

For citation: Belchikhina A. V., Shibayev M. A., Selyanin A. M., Karaulov A. K. Contemporary issues in ensuring biological safety during disposal of biological wastes of animal origin by incineration in the Russian Federation. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (1): 85–92. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-85-92.

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

For correspondence: Anastasia V. Belchikhina, Junior Researcher, Information and Analysis Centre, FGBl "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: selyanin@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

В результате деятельности предприятий и личных подсобных хозяйств граждан в субъектах Российской Федерации ежегодно образуется значительное количество биологических отходов животного происхождения, среди которых трупы животных и птиц, абортированные и мертворожденные плоды, ветеринарные конфискаты, выявленные после ветеринарно-санитарной экспертизы на убойных пунктах, мясо-, рыбоперерабатывающих предприятиях, рынках, в организациях торговли и других объектах [1–4]. Обезвреживание биологических отходов животного происхождения является важной составляющей обеспечения эпизоотического благополучия как страны в целом, так и отдельных ее территорий – субъектов РФ [5, 6].

Согласно ветеринарному законодательству РФ, обезвреживание биоотходов животного происхождения осуществляется тремя способами: утилизацией путем переработки на ветеринарно-санитарных утилизационных заводах (цехах) по производству мясокостной муки; обеззараживанием в биотермических ямах; уничтожением в установках по сжиганию биологических отходов животного происхождения, таких как трупосжигательные печи, крематоры и инсинераторы. Биологические отходы животного происхождения категорически запрещено закапывать в землю, сбрасывать в бытовые мусорные контейнеры, леса, поля, овраги, водные объекты, а также вывозить на свалки и полигоны [1, 6–8].

Вспышки инфекционных болезней животных создают серьезные проблемы для государственной вете-

ринарной службы субъектов РФ. Ключевым моментом успешного реагирования на возникновение болезни является правильная утилизация и уничтожение туш животных и птиц, которые погибли или были отчуждены во время вспышки. Должная и эффективная их утилизация может помочь в предупреждении или снижении дальнейшего распространения патогенов, в число которых могут входить возбудители зоонозов [9–11].

На протяжении последнего десятилетия на территории РФ почти ежегодно регистрируются вспышки гриппа птиц, африканской чумы свиней и бешенства. При возникновении данных болезней трупы животных, а также биологические материалы и животноводческая продукция, зараженная или контаминированная возбудителями, подвергаются обязательному сжиганию. Утилизация путем сжигания сотен, а иногда и тысяч трупов животных является сложной технической задачей, решение которой требует привлечения значительных технических, людских и денежных ресурсов.

На сегодняшний день в стране применяют два основных способа сжигания биологических отходов животного происхождения.

Первый предусматривает использование специальных установок, обеспечивающих высокое качество сгорания биологических отходов за счет оснащения камер сжигания специальными горелками и камерами дожига, а также системой очистки отходящих газов и теплообменного оборудования. Сборка и возведение данных установок занимает достаточно длительное время, что неприемлемо в условиях эпизоотии. Кроме того, работа на таких установках требует профессиональ-

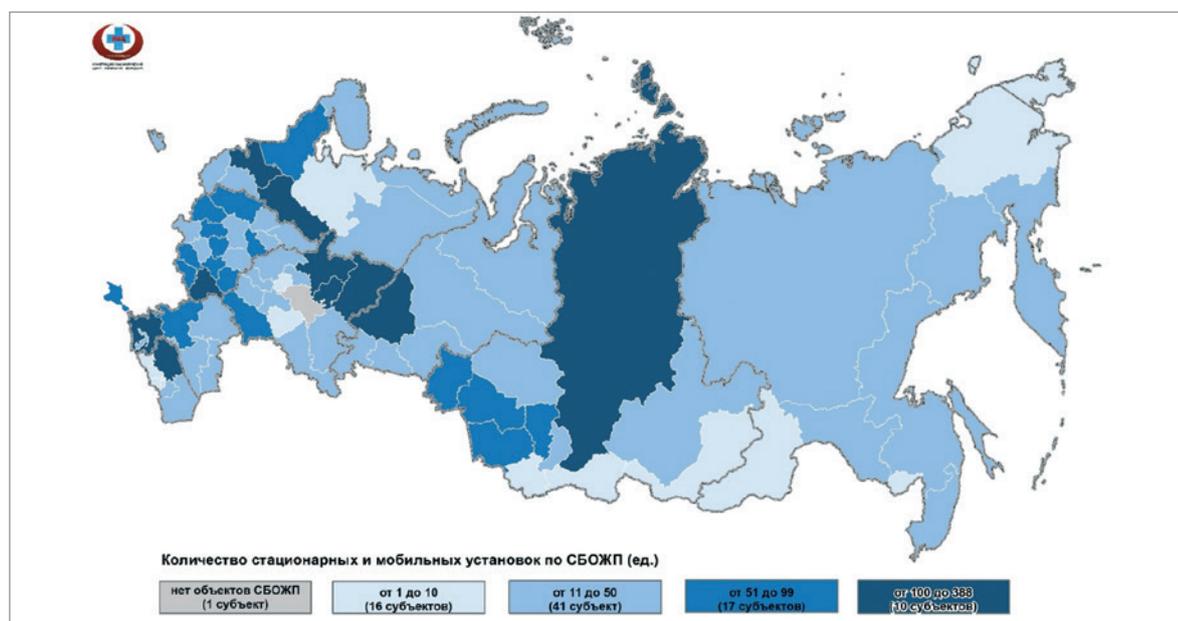


Рис. 1. Общее количество установок для сжигания биоотходов животного происхождения (СБОЖП), зарегистрированных на территории РФ (по состоянию на 01.01.2021)

Fig. 1. Total number of animal biowaste incineration units registered in the RF (as of 01.01.2021)

ной подготовки обслуживающего персонала. Наряду со стационарными существуют мобильные установки, которые можно транспортировать практически любым видом транспорта и устанавливать на месте буквально за несколько минут, но, как правило, они имеют незначительную производительность [12, 13].

Наиболее общепринятым и часто встречающимся на территории РФ является второй способ – сжигание биологических отходов животного происхождения в траншеях. Преимущество данного метода на первый взгляд очевидно – относительная простота и низкие затраты. Однако сжигание таким способом малоэффективно, поскольку процесс горения в них биологических отходов животного происхождения происходит недостаточно активно вследствие незначительного поступления в зону горения кислорода [14, 15]. Способ сжигания биоотходов животного происхождения в траншеях должен постепенно вытесняться более современными методами, но, как показывает практика, он используется до сих пор даже в странах с высоко развитыми технологиями.

В связи с этим целью работы явилось рассмотрение ситуации в стране в области обеспечения биологической безопасности при сжигании биологических отходов животного происхождения в установках, предназначенных для данных целей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В целях проведения исследования специалистами ФГБУ «ВНИИЗЖ» была разработана форма для сбора первичных данных, включающая такие показатели, как количество, вид (стационарные, мобильные), форма собственности, расположение, наличие сертификата и квалифицированных специалистов, обслуживающих объекты сжигания биологических отходов животного происхождения, а также потребность субъектов в данных установках. Также был организован единовременный (одномоментный) сбор информации по

указанной форме за период с 01.01.2020 по 01.01.2021 посредством системы оперативной отчетности «Ас-соль.Экспресс». Собранные по 85 субъектам РФ первичные данные были подвергнуты анализу.

В исследовании использовались общепринятые методы анализа данных: обобщение и формализация информации, метод сравнительного анализа, методы описательной статистики.

С целью визуализации полученных данных в виде карт использовали географическую информационную систему ArcGIS 10.6.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общие показатели. По состоянию на 01.01.2021 на территории РФ зарегистрировано 4459 установок по сжиганию биологических отходов животного происхождения, которые располагаются во всех субъектах страны, за исключением Республики Татарстан.

Общее количество трупосжигательных печей в разрезе субъектов РФ находится в диапазоне от 2 до 388 ед., значительная их часть (45%) сосредоточена в 10 субъектах страны. При этом для 16 регионов данный показатель не превышает 10 ед., а в 41 субъекте страны общее число объектов по сжиганию биологических отходов находится в пределах от 11 до 50 ед. (рис. 1).

Результаты анализа данных по такому показателю, как хозяйственная принадлежность установок, свидетельствуют о том, что 78% объектов находится в собственности или на балансе организаций различных форм собственности (СПК, ОАО, ЗАО, ИП и т.д.), деятельность которых связана с содержанием/выращиванием сельскохозяйственных животных, а также переработкой, производством и хранением животноводческой продукции. Наименьшая их часть приходится на муниципальные образования субъектов РФ (7,8%) (рис. 2).

В субъектах РФ наибольшая часть (95%) данных установок являются стационарными. Количество мобильных трупосжигательных печей в стране

составляет 231 ед., которые зарегистрированы в 44 регионах. В большинстве из них число мобильных установок по сжиганию биологических отходов находится в диапазоне от 1 до 7 ед., при этом около половины сосредоточено на территории 5 субъектов.

В последние годы в РФ отмечается тенденция к сокращению числа скотомогильников и биотермических ям. В первую очередь это связано с введением в 2006 г. запрета на уничтожение биологических отходов путем захоронения и наличием значительного количества скотомогильников, не находящихся в хозяйственном ведении или оперативном управлении у юридических лиц, которые отвечали бы за их содержание, сохранность и использование [3]. Вследствие этого в некоторых субъектах РФ были разработаны и введены в действие целевые программы по ликвидации неиспользуемых и бесхозных скотомогильников, целью которых является недопущение несанкционированного захоронения биологических отходов и распространения возбудителей заразных болезней животных и людей в окружающей среде, а также снижение расходов регионального бюджета на содержание и поддержание ветеринарно-санитарного состояния данных скотомогильников.

Таким образом, муниципальные образования субъектов РФ, подведомственные учреждения государственной ветеринарной службы субъектов РФ, а также животноводческие и перерабатывающие предприятия постепенно переходят от захоронения в скотомогильниках к утилизации в установках по сжиганию биологических отходов животного происхождения (крематоры, инсинераторы, трупосжигательные печи). В отчетном периоде вышеуказанные учреждения приобрели и ввели в эксплуатацию 266 трупосжигательных печей, причем 82% из них приходится на организации, деятельность которых связана с содержанием, выра-

щиванием сельскохозяйственных животных, а также с переработкой, производством и хранением животноводческой продукции.

Несмотря на то что за период с 01.01.2020 по 01.01.2021 количество объектов по сжиганию биологических отходов животного происхождения в стране увеличилось на 10%, в 44 субъектах РФ отмечается дополнительная потребность в 2129 трупосжигательных печах (рис. 2). Для части регионов данный показатель варьирует в диапазоне от 1 до 728 ед., для 41% субъектов потребность в трупосжигательных печах не превышает 10 ед.

Требование к процессу сжигания биологических отходов животного происхождения в кремационных печах. Утилизация и уничтожение биологических отходов животного происхождения регулируется «Ветеринарными правилами перемещения, хранения, переработки и утилизации биологических отходов», утвержденными приказом Минсельхоза России от 26 октября 2020 г. № 626 [1].

Данные правила устанавливают обязательные ветеринарно-санитарные требования к обращению с биологическими отходами животного происхождения (сбор, транспортировка, хранение, утилизация, уничтожение) как для владельцев животных, независимо от способа ведения хозяйства, так и для организаций и предприятий всех форм собственности.

Однако в ветеринарном законодательстве РФ отсутствует нормативно-правовой акт, регламентирующий порядок проведения сжигания биологических отходов животного происхождения в трупосжигательных печах. Следовательно, не предусмотрены обязательные требования, предъявляемые к техническим характеристикам установок для сжигания биологических отходов (обязательная сертификация, производительная мощность, объем камеры, толщина стенок

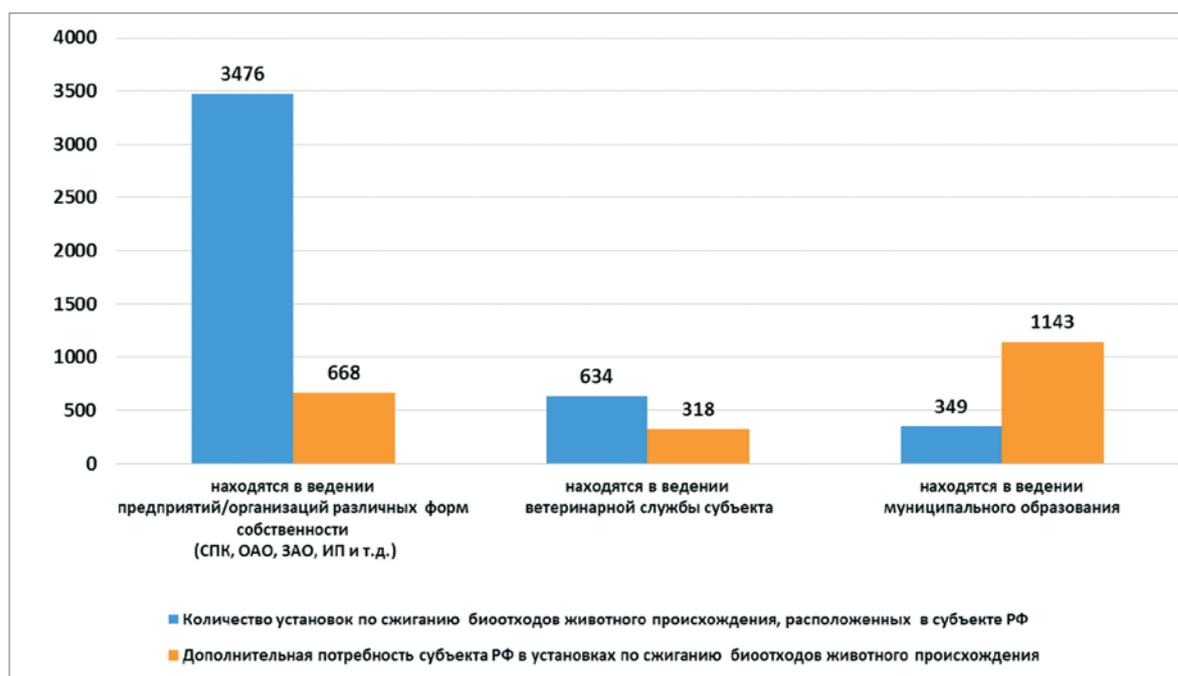


Рис. 2. Количество и дополнительная потребность страны в установках по сжиганию биоотходов животного происхождения

Fig. 2. Animal biowaste incinerator availability and demand in the country



Рис. 3. Регулирование и порядок проведения процедуры сжигания биотходов животного происхождения (СБОЖП) в трупосжигательных печах, крематоров и инсинераторов

Fig. 3. Animal biowaste incineration procedure in home made incinerators, cremating furnaces and incinerators and its control

корпуса и т. д.), к их размещению (технические требования к помещению и ограждению, где расположены данные устройства) и к самому процессу сжигания в данных установках (требования к обслуживающему персоналу, дезинфекции инвентаря, транспорта и спецодежды, способу уничтожения полученных продуктов горения и т. д.) (рис. 3).

Факт отсутствия законодательной регуляции данного способа уничтожения биотходов затрудняет полноценное осуществление контрольными органами в области ветеринарии контрольно-надзорных мероприятий на предмет соответствия ветеринарно-санитарным требованиям, предъявляемым к установкам по сжиганию биологических отходов животного происхождения.

Согласно ветеринарному законодательству ветеринарный специалист после осмотра биологических отходов животного происхождения дает заключение об их уборке и методе обезвреживания, а также оформляет ветеринарный сопроводительный документ. Доставку биотходов к месту уничтожения обеспечивают их владельцы. Биологические отходы помещают в специальные закрытые емкости и доставляют предназначенным для данных целей транспортом. Перемещение трупов животных, масса каждого из которых составляет более 25 кг, кроме трупов животных, загрязненных возбудителями сибирской язвы, чумы крупного рогатого скота, допускается осуществлять без использования емкостей для биологических отходов животного происхождения в кузовах транспортных средств, накрытых тентами или иными приспособлениями, не

допускающими выпадение трупов и контаминацию объектов внешней среды [1]. Данный транспорт может принадлежать как собственникам биотходов, так и организациям, оказывающим услуги по уничтожению или утилизации биологических отходов животного происхождения. При этом следует отметить, что используемые емкости и транспорт для перемещения биологических отходов животного происхождения не подлежат обязательной сертификации или паспортизации.

Поскольку трупосжигательные печи являются объектами повышенной опасности, для данных установок необходимо подтверждение соответствия качества установленным требованиям ветеринарно-санитарной, экологической и противопожарной безопасности.

В настоящий момент, согласно российскому законодательству, обязательная сертификация установок по сжиганию биологических отходов предусмотрена только в отношении противопожарной безопасности. Причем сертификатом соответствия подтверждается качество не всей установки, а только ее отдельной составной части, в частности используемой в ней горелки (газовой, жидкотопливной) [16]. Получение экологического сертификата соответствия нормам экобезопасности для производителей установок по сжиганию биологических отходов носит добровольный характер [17].

Что касается сертификации соответствия объектов по сжиганию биологических отходов животного происхождения в отношении ветеринарно-санитарной безопасности, то данная процедура не предусмотрена законодательством РФ. В связи с этим не представляется

возможным определить адекватность выбора и соблюдения температурно-временных режимов для уничтожения различных категорий и видов биологических отходов животного происхождения. Хотя именно эти характеристики являются определяющим фактором в способности установок по сжиганию биоотходов обеспечить полную инактивацию возбудителей болезней животных.

Исходя из практического опыта специалистов, участвовавших в ликвидации очагов инфекционных болезней животных, можно отметить, что трупы разнообразных видов животных сгорают за разные промежутки времени и при определенных температурах. К примеру, тушки индеек по сравнению с тушами свиной недостаточной хорошо горят, что связано с разностью химического состава и плотности их мышечной массы.

В отчетном периоде 28% используемых для сжигания биологических отходов животного происхождения установок в стране даже не имеют противопожарных и экологических сертификатов соответствия. Таким образом, можно с большой долей уверенности предположить, что данные объекты изготовлены не промышленным, а кустарным способом, то есть при их создании могли использоваться любые подручные средства: бочки, газовые баллоны, сварные котлы и т. д. Использование подобного рода установок при сжигании биологических отходов не может обеспечить полную инактивацию возбудителей инфекционных болезней животных и, следовательно, надлежащий уровень биологической защищенности животных и человека от воздействия указанных возбудителей.

Согласно статье 7.1.12 СанПиН 2.2.1/2.1.1.1200-03 «Санитарно-защитные зоны и санитарная классификация предприятий, сооружений и иных объектов»¹, трупосжигательные печи относятся к I классу опасности. В целях обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения вокруг объектов по сжиганию биологических отходов животного происхождения устанавливается специальная территория радиусом 1000 м с особым режимом использования (санитарно-защитная зона). Однако в 36 субъектах РФ трупосжигательные печи (502 ед.) расположены в пределах зоны жилой застройки. Основная часть указанных объектов сосредоточена в Центральном (37%) и Сибирском (31%) федеральных округах.

Следует отметить, что соблюдение данного требования невыполнимо для собственников мобильных установок по сжиганию биологических отходов животного происхождения, так как размещение данных объектов на территории населенного пункта во время проведения уничтожения в них биологических отходов не регламентировано.

Существенным условием обеспечения биологической безопасности при сжигании биоотходов является правильное устройство помещения или сооружения, где размещаются установки по сжиганию биологических отходов животного происхождения и вспомогательные помещения различного назначения: вскрыточная, склад для хранения дезсредств, инвентаря и т. д.

¹ СанПиН 2.2.1/2.1.1.1200-03 Санитарно-защитные зоны и санитарная классификация предприятий, сооружений и иных объектов: утв. постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 25.09.2007 № 74. Режим доступа: <https://base.garant.ru/12158477/b89690251be5277812a78962f6302560>.

На данный момент в стране законодательством не предусмотрено регламентированных норм и правил, предъявляемых к данным помещениям.

Сжигание биологических отходов и обслуживание объекта для их термической обработки требует наличия квалифицированного персонала. К работе с данными установками необходимо допускать лиц, прошедших обучение и проверку знаний о технических характеристиках, принципах эксплуатации и обслуживания трупосжигательных печей. Помимо этого, персонал должен иметь разрешительный документ на право обращения с опасными отходами и пройти иммунизацию в соответствии с национальным календарем профилактических прививок.

При проведении исследования установлено, что 46% объектов по сжиганию биологических отходов животного происхождения обслуживает персонал, не прошедший соответствующую подготовку. Отсутствие необходимых знаний в части технических характеристик установок, а также процесса сжигания, дезинфекции и т. д. может способствовать распространению возбудителей инфекционных болезней животных во внешнюю среду.

В системе ветеринарно-санитарных мероприятий, обеспечивающих благополучие территории РФ по различным болезням животных, ведущую роль играет дезинфекция. Основным ее назначением является уничтожение или обезвреживание возбудителей заразных болезней животных (птиц, рыб, пчел) в окружающей среде [18].

В связи с этим установки для термической обработки отходов, инвентарь, спецодежду и транспортные средства, используемые при перемещении и сжигании биологических отходов животного происхождения, следует обрабатывать дезинфекционными средствами. Дезинфекцию должны проводить обученные специалисты под контролем государственной ветеринарной службы. Сотрудники, ответственные за проведение дезинфекции, также осуществляют отбор проб для контроля качества дезинфекции и ведут документацию (акты на проведение дезинфекции, журнал учета получения, расхода дезинфицирующих средств и проведения дезинфекционных работ на объекте). Контроль качества проведенной дезинфекции необходимо подтверждать после каждого сжигания биологических отходов.

Несмотря на существенное уменьшение в объеме (до 95%) биологических отходов животного происхождения после сжигания, в трупосжигательных печах остаются продукты горения (зола и другие негорючие остатки), уничтожение которых осуществляется различными допустимыми методами. В отчетном периоде в субъектах РФ полученные продукты горения после сжигания биологических отходов животного происхождения в большинстве случаев (63%) вывозили на полигоны твердых бытовых отходов или сбрасывали в биотермические ямы, в 17% случаев их закапывали в землю на территории скотомогильников, а в 20% случаев (в 31 субъекте РФ) использовали в виде удобрения, что является нарушением российского законодательства, поскольку данный зольный остаток не представлен в списке сертифицированных удобрений РФ.

Как было отмечено ранее, почти треть установок, имеющих в стране, изготовлены непромышленным способом, т. е. использование данных печей не га-

рантирует полного сжигания биологических отходов животного происхождения и инактивацию патогенов. Следовательно, вывоз остатков продуктов горения на полигоны твердых бытовых отходов способствует контаминации территорий возбудителями инфекционных болезней животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного аналитического исследования показывают, что по состоянию на 1 января 2021 г. в РФ в сфере сжигания биологических отходов животного происхождения содержится ряд пробелов, которые обусловлены как несовершенством регулирующей базы, так и недостатками организации данной системы в субъектах страны.

В первую очередь это связано с тем, что на законодательном уровне не предусмотрены правила, регламентирующие порядок проведения сжигания биологических отходов животного происхождения в трупосжигательных печах. При этом ситуация усугубляется тем, что значительная часть субъектов РФ использует изготовленные кустарным способом установки для сжигания биологических отходов животного происхождения, не имеющие сертификатов соответствия в области пожарной и экологической безопасности. Около половины трупосжигательных печей обслуживает неквалифицированный персонал, который не владеет знаниями о технических характеристиках и принципах работы данных установок.

Текущая ситуация в стране в области обеспечения биологической безопасности при сжигании биологических отходов животного происхождения в трупосжигательных печах свидетельствует о необходимости введения следующих корректирующих мер: закрепление на законодательном уровне требований, предъявляемых к техническим характеристикам трупосжигательных печей и процессу уничтожения в них биологических отходов животного происхождения; разработка и принятие нормативно-правового акта, регламентирующего деятельность мобильных установок для термообработки биологических отходов; разработка единых форм учета объектов по сжиганию биоотходов; формирование единых проверочных листов (чек-листов, списков контрольных вопросов) с целью использования их ветеринарными службами при проведении плановых и внеплановых проверок в отношении объектов сжигания биологических отходов животного происхождения; введение обязательной сертификации установок по сжиганию биологических отходов на соответствие установленным требованиям ветеринарно-санитарной безопасности.

Также необходимо внести дополнения в существующие компоненты АИС «Цербер» информационной платформы «ВетИС», которые позволят создать федеральный реестр объектов по сжиганию биологических отходов животного происхождения, подтвердивших свою ветеринарно-санитарную безопасность, что, в свою очередь, позволит в системе «Меркурий» блокировать оформление ветеринарных сопроводительных документов на перемещение биологических отходов к объектам утилизации и уничтожения, не указанным в данном реестре.

Выполнение вышеуказанных мер позволит повысить контроль за безопасностью уничтожения биоло-

гических отходов животного происхождения в установках, предназначенных для их сжигания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ветеринарные правила перемещения, хранения, переработки и утилизации биологических отходов: утв. приказом Минсельхоза России от 26.10.2020 № 626. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/566144088>.
2. ГОСТ 30772-2001 Ресурсосбережение. Обращение с отходами. Термины и определения. М.: Стандартинформ; 2008. 16 с. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200028831>.
3. Бельчихина А. В., Шибяев М. А., Клиновицкая И. М., Караулов А. К. Состояние системы утилизации и уничтожения биологических отходов животного происхождения в субъектах Российской Федерации. *Ветеринария сегодня*. 2019; (4): 54–60. DOI: 10.29326/2304-196X-2019-4-31-54-60.
4. Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор). Об оформлении ветеринарных сопроводительных документов на биологические отходы. Режим доступа: <https://fsvps.gov.ru/fsvps/news/39214.html>.
5. Закон РФ «О ветеринарии» от 14.05.1993 № 4979-1 (ред. от 02.07.2021). *КонсультантПлюс*. Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_4438.
6. Федеральный закон «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 30.03.1999 № 52-ФЗ (ред. от 03.08.2018). *КонсультантПлюс*. Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_22481.
7. Бондарева Е. Д. Надлежащее обращение с биологическими и медицинскими отходами вивариев. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2020; (1): 3–8. DOI: 10.29296/2618723X-2020-01-01.
8. Зройчиков Н. А., Фадеев С. А., Хасхакич В. В., Бирюков Я. А. Анализ путей экологически безопасного обезвреживания медицинских и биологических отходов. *Наука сегодня: проблемы и перспективы развития: материалы Международной научно-практической конференции (29 ноября 2017 г.)*. Вологда; 2017; 108–113. eLIBRARY ID: 32502937.
9. Ершов А. Г., Шубников В. Л. Медицинские и биологические отходы: проблемы и пути решения. *Твердые бытовые отходы*. 2011; 2 (56): 16–19. eLIBRARY ID: 15566020.
10. Элдесбаев Э. Н., Петрова И. В., Котельникова Е. А. Анализ современных направлений обращения с биологическими отходами в системе экономики природопользования. *Управление экономическими системами: электронный научный журнал*. 2015; 3 (75):31. eLIBRARY ID: 23306512.
11. Miller L. P., Miknis R. A., Flory G. A. Carcass management guidelines – Effective disposal of animal carcasses and contaminated materials on small to medium-sized farms. *FAO Animal Production and Health Guidelines*. Rome: FAO; 2020; No. 23. DOI: 10.4060/cb2464en.
12. Мкртумян А. В., Кудрявцев Е. А., Коржевенко Г. Н. Проблемы сжигания биологических отходов при эпизоотиях. *Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии»*. 2012; 2 (8): 57–58. eLIBRARY ID: 22911832.
13. Поклонский Д. Л., Матвеев А. В., Чифанов Д. Е., Дурилов О. Ю., Зыгин Д. А., Ермилов Н. В. и др. Методические аспекты утилизации павших животных при ликвидации очагов эпизоотии. *Вестник войск РХБ защиты*. 2017; 1 (4): 50–58. eLIBRARY ID: 36479177.
14. Смирнов А. М., Бутко М. П., Коржевенко Г. Н., Кудрявцев Е. А., Мкртумян А. В. Способ сжигания инфицированных биологических отходов, в том числе трупов животных. Патент № 2540745 Российской Федерации, МПК F23G 1/00 (2006.01). Государственное научное учреждение ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Российской академии сельскохозяйственных наук. № 2013151376/03. Заявл. 20.11.2013. Опубл. 10.02.2015. Бюл. № 4.
15. Мкртумян А. В., Кудрявцев Е. А. Технологические аспекты сжигания трупов павших и вынужденно убитых животных при эпизоотии. *Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии»*. 2015; 3 (15): 72–74. eLIBRARY ID: 24260568.
16. Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 010/2011 «О безопасности машин и оборудования»: утв. решением Комиссии Таможенного союза от 18.10.2011 № 823. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/902307904>.
17. Об организации системы сертификации по экологическим требованиям для предупреждения вреда окружающей природной среде (системы экологической сертификации): приказ Министерства охраны окружающей среды и природных ресурсов РФ от 23.01.1995 № 18. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/9027409>.
18. Правила проведения дезинфекции и дезинвазии объектов государственного ветеринарного надзора: утв. Минсельхозом РФ от 15.07.2002 № 13-5-2/0525. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200112793>.

REFERENCES

1. Veterinarnye pravila peremeshcheniya, khraneniya, pererabotki i utilizatsii biologicheskikh otkhodov = Veterinary rules for movement, storage, rendering and disposal of biological wastes; approved by the Russian MoA Order No. 626 as of October 26, 2020. Available at: <https://docs.cntd.ru/document/566144088>. (in Russ.)
2. GOST 30772-2001 Resources saving. Waste treatment. Terms and definitions. Moscow: Standartinform; 2008. 16 p. Available at: <https://docs.cntd.ru/document/1200028831>. (in Russ.)
3. Belchikhina A. V., Shibaev M. A., Klinovitskaya I. M., Karaulov A. K. The state of animal waste rendering and disposing system in the subjects of the Russian Federation. *Veterinary Science Today*. 2019; (4): 54–60. DOI: 10.29326/2304-196X-2019-4-31-54-60.
4. Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance (Rosselkhozadzor). Ob oformlenii veterinarnykh soprovoditel'nykh dokumentov na biologicheskie otkhody = On issuance of veterinary accompanying documents for biological wastes. Available at: <https://fsvps.gov.ru/fsvps/news/39214.html>. (in Russ.)
5. Zakon RF «O veterinarii» = RF Veterinary Law, May 14, 1993 No. 4979-1 (as amended on 02.07.2021). *ConsultantPlus*. Available at: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_4438. (in Russ.)
6. Federal'nyi zakon «O sanitarno-epidemiologicheskoy blagopoluchii naseleniya» = Federal Law "On sanitary and epidemiological safety of the population" No. 52-FZ as of March 30, 1999 No. 52-FZ (as amended on 03.08.2018). *ConsultantPlus*. Available at: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_22481. (in Russ.)
7. Bondareva E. D. Proper waste management. Vivarium biological waste. *Laboratory Animals for Science*. 2020; (1): 3–8. DOI: 10.29296/2618723X-2020-01-01. (in Russ.)
8. Zroichikov N. A., Fadeev S. A., Khaskhachikh V. V., Biryukov Ya. A. Analiz putei ekologicheskoi bezopasnoy obezvrezhivaniya meditsinskikh i biologicheskikh otkhodov = Analysis of sustainable methods for medical and biological waste decontamination. *Nauka segodnya: problemy i perspektivy razvitiya = Science today: problems and development prospects: materials of the International Scientific and Practical Conference (November 29, 2017)*. Vologda; 2017; 108–113. eLIBRARY ID: 32502937. (in Russ.)
9. Ershov A. G., Shubnikov V. L. Meditsinskie i biologicheskie otkhody: problemy i puti resheniya = Medical and biological waste: problems and solutions. *Tverdye bytovye otkhody*. 2011; 2 (56): 16–19. eLIBRARY ID: 15566020. (in Russ.)
10. Eldesbaev E. N., Petrova I. V., Kotel'nikova E. A. Analysis of modern trends handling system biowaste environmental economics. *Upravlenie ekonomicheskimi sistemami: elektronnyi nauchnyi zhurnal*. 2015; 3 (75):31. eLIBRARY ID: 23306512. (in Russ.)
11. Miller L. P., Miknis R. A., Flory G. A. Carcass management guidelines – Effective disposal of animal carcasses and contaminated materials on small to medium-sized farms. FAO Animal Production and Health Guidelines. Rome: FAO; 2020; No. 23. DOI: 10.4060/cb2464en.
12. Mkrumyan A. V., Kudryavtsev E. A., Korzhevenko G. N. Problems on burning the biological residues and scraps in case of epizooties. *The Russian Journal "Problems of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology"*. 2012; 2 (8): 57–58. eLIBRARY ID: 22911832. (in Russ.)
13. Poklonskii D. L., Matveev A. V., Chifanov D. E., Durilov O. Yu., Zygin D. A., Ermilov N. V., et al. Methodical aspects of disposal of dead animals in the elimination of the epizootic focus. *Journal of NBC Protection Corps*. 2017; 1 (4): 50–58. eLIBRARY ID: 36479177. (in Russ.)
14. Smirnov A. M., Butko M. P., Korzhevenko G. N., Kudryavtsev E. A., Mkrumyan A. V. Combustion of infected biological wastes including dead animal bodies. Patent No. 2540745 Russian Federation, Int. F23G 1/00 (2006.01). Gosudarstvennoe nauchnoe uchrezhdenie Vserossijskij nauchno-issledovatel'skij institut veterinarnoy sanitarii, gigieny i ehkologii Rossijskoj akademii sel'skokhozhajstvennykh nauk. No. 2013151376/03. Date of filing: 20.11.2013. Date of publication: 10.02.2015. Bull. No. 4. (in Russ.)
15. Mkrumyan A. V., Kudryavtsev E. A. Technological aspects of burning corpses fallen and slaughtered animals at epizootic. *The Russian Journal "Problems of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology"*. 2015; 3 (15): 72–74. eLIBRARY ID: 24260568. (in Russ.)
16. Customs Union Technical Regulation TR CU 010/2011. "On the safety of machines and equipment": approved by the Decision of the Commission of the Customs Union dated October 18, 2011 No. 823. Available at: https://www.bellis.by/upload/docs/accreditation/eaue/CU_TR_010-2011_EN.pdf.
17. Ob organizatsii sistemy sertifikatsii po ekologicheskim potrebaniyam dlya preduprezhdeniya vreda okruzhayushchei prirodnoi srede (sistemy ekologicheskoi sertifikatsii) = On the organization of a certification system for environmental requirements to prevent harm to the environment (ecological certification systems): order of the Ministry of Environmental Protection and Natural Resources of the Russian Federation dated January 23, 1995 No. 18. Available at: <https://docs.cntd.ru/document/9027409>. (in Russ.)
18. Pravila provedeniya dezinfektsii i dezinivazii ob'ektov gosudarstvennogo veterinarnogo nadzora = Rules for disinfection and disinfestation of regulated facilities: approved. Ministry of Agriculture of the Russian Federation July 15, 2002 No. 13-5-2/0525. Available at: <https://docs.cntd.ru/document/1200112793>. (in Russ.)

Поступила в редакцию / Received 13.09.2021

Доработана после рецензирования / Revised 25.11.2021

Принята к публикации / Accepted 08.12.2021

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Бельчихина Анастасия Владимировна, младший научный сотрудник информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Шибяев Михаил Александрович, кандидат ветеринарных наук, заведующий сектором информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Селянин Аркадий Михайлович, ведущий ветеринарный врач информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Караулов Антон Константинович, кандидат ветеринарных наук, руководитель информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Anastasia V. Belchikhina, Junior Researcher, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Mikhail A. Shibayev, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Sector, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Arkady M. Selyanin, Leading Veterinarian, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Anton K. Karaulov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

ЖУРНАЛ «ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ» ПРИГЛАШАЕТ АВТОРОВ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ СВОИХ НАУЧНЫХ РАБОТ

- Журнал основан в 2012 г. на базе ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных».
- Статьи публикуются на двух языках: русском и английском.
- Основными направлениями являются результаты теоретических и экспериментальных исследований в области ветеринарии и ветеринарной микробиологии, тенденций развития ветеринарной науки, обсуждение актуальных вопросов в области мониторинга и эпизоотологии болезней животных.
- Журнал распространяется по всей территории России, а также в крупнейших мировых научных центрах.
- Мы публикуем статьи как выдающихся, так и молодых ученых, специалистов-практиков, работников ветеринарных учреждений для обмена опытом, обеспечения устойчивого ветеринарного благополучия и новых научных дискуссий.

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.

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: Никешина Татьяна Борисовна,
e-mail: nikeshina@arriah.ru

Узнайте больше на сайте журнала
<http://veterinary.arriah.ru/jour/index>

**«Ветеринария сегодня» –
это прекрасная возможность
заявить о себе миру!**

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 пт). Оптимальный объем статьи: 3000–6000 слов.

Предоставление в редакцию рукописи статьи 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 ПРЕДОСТАВЛЯЕМОЙ СТАТЬИ

1. **УДК**
 2. **Название статьи**
 3. **Имя, отчество, фамилия авторов**, место работы, город, страна, ORCID ID, адрес электронной почты.
 4. **Резюме** (краткое точное изложение содержания статьи, включающее фактические сведения и выводы описываемой работы): 200–250 слов, но не более 2000 знаков.
 5. **Ключевые слова** (5–6 слов, словосочетаний), наиболее точно отображающие специфику статьи.
 6. **Благодарности** (в случае финансирования исследования организацией или желанием выразить благодарность определенным людям).
 7. **Для цитирования**
 8. **Конфликт интересов**
 9. **Для корреспонденции** (фамилия, имя, отчество (полностью), ученая степень, научное звание, должность, адрес, электронная почта).
 10. **Введение**
 11. **Материалы и методы**
 12. **Результаты и обсуждение**
 13. **Выводы или заключение**
 14. **Список литературы** (*ванкуверский стиль* – расположение источников в порядке их цитирования; количество цитируемых работ в оригинальных статьях – около 30, в обзорах – не более 60).
 15. **Информация об авторах** (фамилия, имя, отчество (полностью), ученая степень, научное звание, должность, город, страна).
 16. К размещению принимаются иллюстрированные материалы (фото, графики) 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 пт, 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 уместиться в печатное поле страницы. Название таблицы – над таблицей; название рисунка/графика – под рисунком/графиком. Максимальное суммарное количество таблиц и рисунков в одной статье должно быть не более 5.
- 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.



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

OIE REFERENCE LABORATORY FOR HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA
AND LOW PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA (POULTRY) AND NEWCASTLE DISEASE

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») объявляет о приеме в аспирантуру в 2022 году по двум направлениям подготовки:

36.06.01 Ветеринария и зоотехния
(группа научных специальностей
4.2. Зоотехния и ветеринария),
специальность *06.02.02 Ветеринарная
микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология
с микотоксикологией и иммунология
(4.2.3 Инфекционные болезни
и иммунология животных)* – 9 мест;

06.06.01 Биологические науки
(группа научных специальностей
1.5. Биологические науки),
специальность *03.02.02 Вирусология
(1.5.10 Вирусология)* – 3 места.

НЕОБХОДИМЫЕ ДОКУМЕНТЫ:

- заявление на имя директора ФГБУ «ВНИИЗЖ»;
- документ (документы), удостоверяющий личность и гражданство поступающего;
- оригинал диплома специалиста или диплома магистра;
- список опубликованных научных работ, изобретений и отчетов по научно-исследовательской работе, подписанный в установленном порядке. Лица, не имеющие опубликованных научных работ и изобретений, предоставляют реферат по избранному направлению подготовки;
- документ, свидетельствующий об индивидуальных достижениях поступающего (дипломы победителя или лауреата конкурсов, фестивалей, выставок и т. д.);
- медицинская справка (форма № 086/у);
- фото (4 × 6 см) – 2 шт.

Прием документов для поступления в аспирантуру проводится с 1 июня по 31 августа 2022 года

Поступающие в аспирантуру сдают конкурсные вступительные экзамены в соответствии с государственными образовательными стандартами высшего профессионального образования по специальной дисциплине, философии, иностранному языку.

Адрес приемной комиссии:

600901, г. Владимир, мкр. Юрьевец,
ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья
животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

Телефоны для справок:

(4922) 52-99-62; 26-15-12 (доб. 22-27, 20-20, 21-11)
Официальный сайт ФГБУ «ВНИИЗЖ»: www.arriah.ru

Испытательный центр ФГБУ «ВНИИЗЖ»

Областью деятельности Испытательного центра 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 нормативных документов Российской Федерации.

Испытательный центр был создан и аккредитован Федеральным агентством по техническому регулированию 26 августа 2005 г. В 2015 г. Испытательный центр ФГБУ «ВНИИЗЖ» был аккредитован Федеральной службой по аккредитации (Росаккредитация) на соответствие требованиям ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий». С 2020 г. центр работает в соответствии с ГОСТ ISO/IEC 17025-2019 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий».

В 2014 г. Испытательный центр внесен в Реестр испытательных лабораторий Таможенного союза, что дает право проводить исследования, которые признаются во всех странах-участниках в зоне Таможенного союза и в России.

В 2015 г. Испытательный центр ФГБУ «ВНИИЗЖ» аккредитован в рамках международной аккредитации Словацкой национальной службой по аккредитации SNAS на проведение микробиологических и физико-химических испытаний пищевой продукции, продовольственного сырья, зерна, кормов, природной и питьевой воды в соответствии с диапазоном аккредитации. В августе 2020 г. проведена процедура реаккредитации с продлением срока действия сертификата до октября 2025 г.

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФГБУ «ВНИИЗЖ» ПРОВОДИТ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОДУКЦИИ ПО СЛЕДУЮЩИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ:

- жирно-кислотный состав жировой части молочной продукции (определение фальсификации);
- массовая доля белка, жира, сухого обезжиренного молочного остатка и сахаров;
- кислотность;
- плотность молока;
- наличие фосфатазы (эффективность пастеризации);
- перекисное и кислотное число жира;
- диастазное число;
- наличие ГМО, идентификация ГМО-линий, определение количественного содержания ГМО;
- идентификация видоспецифичной ДНК (КРС, МРС, свинья, птица) в составе кормов, сырья и пищевых продуктов;
- КМАФАнМ;
- БГКП (колиформы);
- патогенные бактерии, в том числе сальмонеллы;
- *Listeria monocytogenes*;
- *Staphylococcus aureus*;
- *Escherichia coli*;
- бактерии рода *Proteus*;
- сульфитредуцирующие клостридии;
- молочнокислые микроорганизмы;
- *Vibrio parahaemolyticus*;
- плесени, дрожжи;
- остаточное содержание антибиотиков;
- содержание токсичных элементов (свинец, мышьяк, кадмий, ртуть);
- содержание бенз(а)пирена;
- содержание пестицидов (ГХЦГ: α -, β -, γ -изомеры; ДДТ и его метаболиты);
- содержание афлатоксина М1;
- содержание полихлорированных бифенилов (ПХБ);
- содержание гистамина;
- содержание оксиметилфурфурола;
- содержание консервантов;
- содержание радионуклидов (цезий-137/стронций-90).

Более подробную информацию можно получить по телефонам 8 (4922) 52-99-22 и 26-17-65 или по электронной почте ic@arriah.ru