



ФГБУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ
ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ
И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ
(РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)

ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

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

VETERINARY SCIENCE TODAY

СЕНТЯБРЬ | SEPTEMBER ТОМ 12 № 3 2023

SCIENTIFIC JOURNAL

ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Метаболические особенности и микрофлора молока
при маститах у коров Амурской области

стр. 228



Способ получения
и хранения гипериммунной
сибирязвенной
сыворотки

стр. 215

Значение РСК и ПЦР в диагностике
экспериментальной инфекции
кроликов, вызванной
Chlamydia psittaci

стр. 222

Филогенетический анализ
дерматофитов, выделенных
от мелких домашних
животных

стр. 259

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

СЕНТЯБРЬ ТОМ 12 № 3 2023

Основан в 2012 г.

VETERINARY SCIENCE TODAY

QUARTERLY SCIENTIFIC JOURNAL

SEPTEMBER VOLUME 12 No. 3 2023

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; <https://orcid.org/0000-0002-0959-5915>; AuthorID: 768521; Тел: 8 (4922) 26-15-12, доб. 22-27

Фото на обложке: Zaharia_Bogdan / Gettyimages

Редакционная коллегия:

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

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

Готов Александр Гаврилович – д-р вет. наук, профессор, ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агроботаники 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, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», г. Щелково, Россия; <https://orcid.org/0009-0000-8984-7002>; AuthorID: 563647

Гулюкин Михаил Иванович – д-р вет. наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, ФГБНУ «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, ФГБНУ «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>; AuthorID: 721219

Ирза Виктор Николаевич – д-р вет. наук, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-7489-1772>; AuthorID: 332278

Кононов Александр Владимирович – д-р вет. наук, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-5523-3261>; AuthorID: 768208

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>; AuthorID: 751960; Scopus Author ID: 6504022390

Кузьмина Елена Васильевна – д-р вет. наук, Краснодарский научно-исследовательский ветеринарный институт – обособленное структурное подразделение ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии», г. Краснодар, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-4744-0823>; AuthorID: 359696; Scopus Author ID: 57192088323

Ломако Юрий Васильевич – канд. вет. наук, доцент, РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского», г. Минск, Беларусь; <https://orcid.org/0000-0002-9611-8286>; AuthorID: 1049578; 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>; AuthorID: 78150; Scopus Author ID: 7401689971

Махамат Нгурабе Ямтитина – канд. вет. наук, Комратский государственный университет, г. Комрат, Молдова; <https://orcid.org/0000-0002-2738-0408>; AuthorID: 1064174

Метлин Артем Евгеньевич – д-р вет. наук, г. Вена, Австрия, e-mail: metlin@aea.org; <https://orcid.org/0000-0002-4283-0171>; AuthorID: 149714; 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>; AuthorID: 762858; 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>; AuthorID: 94733; 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>; AuthorID: 768437; 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>; AuthorID: 410076

Пронин Валерий Васильевич – д-р биол. наук, профессор, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-6240-3062>; AuthorID: 666636; ResearcherID: C-3433-2014

Прохватилова Лариса Борисовна – канд. биол. наук, доцент, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-9560-0724>; AuthorID: 49638; 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>; AuthorID: 416163; Scopus Author ID: 6504372679

Русалеев Владимир Сергеевич – д-р вет. наук, профессор, г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-4972-6326>; AuthorID: 731801

Савченкова Ирина Петровна – д-р биол. наук, профессор, ФГБНУ «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, 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>; AuthorID: 702788

Соколович Марьяна – PhD в области ветеринарии, Хорватский ветеринарный институт, Центр птицеводства, г. Загреб, Хорватия; <https://orcid.org/0000-0003-3373-7415>; Scopus Author ID 21835149800

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; <https://orcid.org/0000-0002-2449-0097>; AuthorID: 709795

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>; AuthorID: 80671

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>; AuthorID: 705819; Scopus Author ID: 57204228517

Шахов Алексей Гаврилович – д-р вет. наук, профессор, член-корреспондент РАН, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии Россельхозакадемии», г. Воронеж, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-6177-8858>; AuthorID: 49638

Шкуратова Ирина Алексеевна – д-р вет. наук, профессор, член-корреспондент РАН, Уральский НИВИ – структурное подразделение ФГБНУ УрФАНИЦ УрО 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
Ответственный редактор: Гусева Елена
Редактор-координатор: Мигулина Юлия
Редактор-корректор ФГБУ «ВНИИЗЖ»:
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 RSCI 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>.

Тираж 1150 экземпляров.
Цена свободная
Подписку на научный журнал «Ветеринария сегодня» можно оформить через Агентство по подписке ООО «УРАЛ-Пресс 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: 15 сентября 2023 года
Дата выхода в свет: 4 октября 2023 года

Creative Commons
Attribution 4.0 License



16+

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, FGBl "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 Nikeskina, Candidate of Science (Biology), FGBl "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: nikeskina@arriah.ru;

<https://orcid.org/0000-0002-0959-5915>; AuthorID: 768521; Tel.: +7 (4922) 26-15-12, ext. 22-27

Cover photo: Zaharia_Bogdan / Gettyimages

Editorial Board:

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

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; ResearcherID: K-9491-2015

Alexander G. Glotov – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Siberian Federal Research Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences (SFSCA 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; <https://orcid.org/0009-0000-8984-7002>; 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), FGBl "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>; AuthorID: 721219

Victor N. Irza – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), FGBl "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-7489-1772>; AuthorID: 332278

Alexander V. Kononov – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), FGBl "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-5523-3261>; AuthorID: 768208

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>; AuthorID: 751960; 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>; AuthorID: 359696; Scopus Author ID: 57192088323

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>; AuthorID: 1049578; 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>; AuthorID: 78150; Scopus Author ID: 7401689971

Mahamat Nguerabe Yamtinina – Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Comrat State University, Komrat, Moldova; <https://orcid.org/0000-0002-2738-0408>; AuthorID: 1064174

Artem Ye. Metlin – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Vienna, Austria, e-mail: metlin@iaea.org; <https://orcid.org/0000-0002-4283-0171>; AuthorID: 149714; Scopus Author ID: 6505942586; ResearcherID: Z-2189-2019

Vladimir A. Mischenko – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, FGBl "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-3751-2168>; AuthorID: 762858; 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>; AuthorID: 94733; 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>; AuthorID: 768437; 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>; AuthorID: 410076

Valery V. Pronin – Dr. Sci. (Biology), Professor, FGBl "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-6240-3062>; AuthorID: 666636; ResearcherID: C-3433-2014

Larisa B. Prokhvatilova – Cand. Sci. (Biology), Associate Professor, FGBl "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-9560-0724>; AuthorID: 49638; Scopus Author ID: 36244177300

Olga V. Pruntova – Dr. Sci. (Biology), Professor, FGBl "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-3143-7339>; AuthorID: 416163; Scopus Author ID: 6504372679

Vladimir S. Rusaleyev – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-4972-6326>; AuthorID: 731801

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, Moscow, Russia; AuthorID: 508887

Pavel N. Sisayagin – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Associate Member of the Russian Academy of Sciences, Nizhny Novgorod, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-1085-220X>; AuthorID: 702788

Marijana Sokolovic – PhD/DVM, Croatian Veterinary Institute, Poultry Centre, Zagreb, Croatia; <https://orcid.org/0000-0003-3373-7415>; Scopus Author ID: 21835149800

Sergey K. Starov – Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Deputy Editor-in-Chief, FGBl "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; <https://orcid.org/0000-0002-2449-0097>; AuthorID: 709795

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>; AuthorID: 80671

Sergei 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), FGBl "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>; AuthorID: 705819; 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>; AuthorID: 49638

Irina A. Shkuratova – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Associate Member of the Russian Academy of Sciences, Ural Research Veterinary Institute – FSBSI UrfASRC, UrB 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
Managing Editor: Elena Guseva
Coordinating Editor: Julia Migulina
Content editor of FGBl "ARRIAH": 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>.

Circulation: 1150. Price: unregulated
Veterinary Science Today Journal can be subscribed through the Ural-Press subscription agency: Subscription code – 83862; 127015, Moscow, Novodmitrovskaya 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, FGBl "ARRIAH"
Publisher: 000 "Veinard", 129626, Moscow, 102 Prospect Mira, bld. 31, office 12
Editorial Board Office: 600901, Vladimir, Yur'evets, FGBl "ARRIAH"
Printing Office: 000 "Grand Print", 152900, Yaroslavl Oblast, Rybinsk, Lugovaya str., 7
Approved for print: September 15, 2023
Issued: October 04, 2023

Creative Commons Attribution 4.0 License



16+

Содержание

ОБЗОРЫ | ЯЩУР

190 Обнаружение антител к неструктурным белкам вируса ящура (обзор)
А. С. Яковлева, А. В. Щербаков

ОБЗОРЫ | ОБЩИЕ ВОПРОСЫ

197 Современные подходы к разработке тест-систем на основе количественной ПЦР в режиме реального времени
**М. И. Доронин, Д. В. Михалишин, А. В. Спрыгин, А. Мазлум,
Т. В. Жбанова, К. Н. Груздев, Е. В. Чернышова**

ОБЗОРЫ | БОЛЕЗНИ ПТИЦ

208 Влияние врожденного и приобретенного иммунитета на патогенез инфекционной бурсальной болезни
А. Н. Семина

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

215 Способ получения и хранения гипериммунной сибиреязвенной сыворотки
С. В. Иванова, Л. А. Мельникова, А. П. Родионов, В. В. Евстифеев

222 Значение РСК и ПЦР в диагностике экспериментальной инфекции кроликов, вызванной *Chlamydia psittaci*
В. В. Евстифеев, Ф. М. Хусаинов, С. И. Яковлев, Р. И. Шангараев, В. И. Еремец

228 Метаболические особенности и микрофлора молока при маститах у коров Амурской области
М. Е. Остякова, И. С. Шульга, В. К. Ирхина, К. С. Косицына, Н. С. Голайдо

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | ЭПИЗООТОЛОГИЯ

233 Эпизоотическая обстановка по инфекционному ринотрахеиту крупного рогатого скота в Карагандинской области Республики Казахстан в 2021–2022 гг.
В. В. Кирпиченко, Ф. А. Бакиева, С. Б. Маманова, Е. К. Оспанов, С. Е. Каймолдина

240 Особенности реализации противоэпизоотических мероприятий по африканской чуме свиней в Китае
М. Д. Лозовой, С. В. Щербинин, А. К. Караулов

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БОЛЕЗНИ КРС

246 Сочетанное применение поливалентной сыворотки и иммуномодуляторов в ранний постнатальный период выращивания телят
Н. В. Шаньшин

253 К функциональной морфологии органов пищеварения новорожденных телят и патогенезу эшерихиоза
С. М. Сулейманов

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БОЛЕЗНИ МЕЛКИХ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ

259 Филогенетический анализ дерматофитов, выделенных от мелких домашних животных
А. М. Смагулова, Е. В. Кухар, Т. И. Глотова, А. Г. Глотов

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | ОБЩИЕ ВОПРОСЫ

265 Оплата труда ветеринарных специалистов государственной ветеринарной службы в субъектах Российской Федерации
И. М. Клиновицкая, М. А. Шибяев, А. К. Караулов, А. М. Селянин

Contents

REVIEWS | FOOT-AND-MOUTH DISEASE

- 190** Detection of antibodies to non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus (review)
A. S. Yakovleva, A. V. Scherbakov

REVIEWS | GENERAL ISSUES

- 197** Current approaches to development of real-time qPCR test-kits
**M. I. Doronin, D. V. Mikhailishin, A. V. Sprygin, A. Mazloun,
T. V. Zhanova, K. N. Gruzdev, E. V. Chernyshova**

REVIEWS | AVIAN DISEASES

- 208** Effect of innate and induced immunity on infectious bursal disease pathogenesis
A. N. Semina

ORIGINAL ARTICLES | VETERINARY MICROBIOLOGY

- 215** Method of obtaining and storing hyperimmune anthrax serum
S. V. Ivanova, L. A. Melnikova, A. P. Rodionov, V. V. Evstifeev
- 222** Role of CFT and PCR in diagnosis of *Chlamydia psittaci* in experimentally infected rabbits
V. V. Evstifeev, F. M. Khusainov, S. I. Yakovlev, R. I. Shangaraev, V. I. Eremets
- 228** Metabolism features and milk microbiota of cows with mastitis in the Amur Oblast
M. E. Ostyakova, I. S. Shulga, V. K. Irkhina, K. S. Kositsyna, N. S. Golaydo

ORIGINAL ARTICLES | EPIZOOTOLOGY

- 233** Epizootic situation for infectious bovine rhinotracheitis in the Karaganda Oblast, the Republic of Kazakhstan, in 2021–2022
V. V. Kirpichenko, F. A. Bakieva, S. B. Mamanova, E. K. Ospanov, S. E. Kaimoldina
- 240** Specific features of African swine fever control activities in China
M. D. Lozovoy, S. V. Shcherbinin, A. K. Karaulov

ORIGINAL ARTICLES | BOVINE DISEASES

- 246** Joint use of polyvalent serum and immunomodulators for calves in early postnatal period
N. V. Shanshin
- 253** Functional morphology of digestive organs of newborn calves and pathogenesis of escherichiosis
S. M. Suleymanov

ORIGINAL ARTICLES | DISEASES OF SMALL PETS

- 259** Phylogenetic analysis of dermatophytes isolated from small domestic animals
A. M. Smagulova, E. V. Kukhar, T. I. Glotova, A. G. Glotov

ORIGINAL ARTICLES | GENERAL ISSUES

- 265** Remuneration of veterinary specialists of the State Veterinary Service in the Russian Federation Subjects
I. M. Klinovitskaya, M. A. Shibayev, A. K. Karaulov, A. M. Selyanin



Обнаружение антител к неструктурным белкам вируса ящура (обзор)

А. С. Яковлева, А. В. Щербаков

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

РЕЗЮМЕ

Ящур – высококонтагиозное вирусное заболевание парнокопытных животных, способное вызывать эпизоотии и наносить большой экономический ущерб. Болезнь остается огромной проблемой в развивающихся странах и представляет постоянную угрозу для развитых стран. Важным инструментом контроля заболевания является обнаружение антител к неструктурным белкам вируса ящура в крови восприимчивых животных. Это единственный способ, позволяющий достоверно дифференцировать вакцинированных животных от переболевших и вирусоносителей. Для выявления антител к неструктурным протеинам вируса ящура разработаны различные модификации твердофазного иммуноферментного анализа. В качестве антигена в них используются рекомбинантные неструктурные белки вируса ящура, чаще всего 3ABC или 3AB. За короткий срок иммуноферментный анализ с использованием рекомбинантных антигенов вируса ящура прошел путь от внутрилабораторного метода до общедоступных коммерческих тест-систем, большинство из которых обладают высокой диагностической специфичностью и чувствительностью. Данный метод широко применяется в надзоре за ящуром. В странах или зонах, благополучных по ящuru без вакцинации, иммуноферментный анализ, основанный на обнаружении антител к неструктурным белкам вируса ящура, применяется как основной метод серологического мониторинга и ретроспективной диагностики заболевания. В благополучных по ящuru странах и зонах с вакцинацией этот метод используется для доказательства отсутствия вирусной инфекции в вакцинированных стадах. В Южной Америке при эрадикации заболевания иммуноферментный анализ, основанный на обнаружении антител к неструктурным белкам вируса ящура, применялся для выявления инфицированных животных, а в настоящее время этот метод используется для мониторинга циркуляции возбудителя в еще неблагополучных по заболеванию странах Азии и Африки, реализующих программу прогрессивного контроля за ящуром. В России, как стране с зонами вакцинации против ящура, данный метод является обязательным инструментом надзора за заболеванием. Обзор составлен на основе анализа 65 источников.

Ключевые слова: обзор, вирус ящура, неструктурные белки, иммуноферментный анализ

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

Для цитирования: Яковлева А. С., Щербаков А. В. Обнаружение антител к неструктурным белкам вируса ящура (обзор). *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (3): 190–196. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-190-196.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Яковлева Анастасия Сергеевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории по особо опасным болезням ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: yakovleva_as@arriah.ru.

Detection of antibodies to non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus (review)

A. S. Yakovleva, A. V. Scherbakov

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

SUMMARY

Foot-and-mouth disease (FMD) is a highly contagious viral disease of cloven-hooved animals that can cause epidemics and great economic losses. The disease remains a huge problem in developing countries and poses a constant threat to developed countries. Detection of antibodies to FMD virus non-structural proteins in the blood of susceptible animals is an important tool for the disease control. This is the only way for reliable differentiation of vaccinated animals from convalescent and virus-carrier animals. Various modifications of solid-phase enzyme immunosorbent assay (ELISA) have been developed for detection of antibodies to FMD virus nonstructural proteins. Recombinant FMD virus non-structural proteins, mostly 3ABC or 3AB, are used as an antigen for such assay. In a short time, recombinant FMD virus antigen-based ELISA has evolved from an in-house laboratory method to commonly available commercial test systems, most of which have high diagnostic specificity and sensitivity. The said method is widely used for FMD surveillance. In the countries and zones free from FMD without vaccination the ELISA for detection of antibodies against FMD virus non-structural proteins is used as a primary method for FMD serological monitoring and retrospective diagnosis. In the countries and zones free from FMD with vaccination this ELISA is used for confirmation of the virus infection absence in vaccinated herds. In South America, ELISA for detection of antibodies against FMD virus non-structural proteins was used for detection of infected animals during the disease eradication. Currently, it is used for monitoring for the virus circulation in still FMD infected Asian and African countries implementing progressive FMD control programme. In Russia having zones where anti-FMD vaccination is carried out this method is a mandatory tool of the disease surveillance. The review is based on the analysis of 65 publications.

ящура (НСП-ИФА), необходимо было решить проблему, связанную с получением антигена. Поскольку очищенные неструктурные белки вируса ящура трудно получать из инфицированной культуры клеток, все исследователи применяли в качестве антигена в НСП-ИФА химически синтезированные пептиды [17, 18] или значительно чаще – рекомбинантные белки [19]. Рекомбинантные белки получали путем молекулярного клонирования и экспрессии соответствующих генов вируса ящура в *Escherichia coli* (*E. coli*) [19–23] или системе бакуловирус – клетки насекомых [24–27].

В качестве антигена в НСП-ИФА испытывались практически все неструктурные белки вируса ящура [28–32]. Многочисленные исследования показали, что наилучшую дифференциацию постинфекционных и поствакцинальных антител против вируса ящура обеспечивало применение в НСП-ИФА рекомбинантных белков ЗАВ или ЗАВС [8, 20, 21, 23, 32–37]. Антигенная активность полипротеина ЗАВС, вероятно, определяется входящими в его состав белками ЗА и ЗВ, а роль белка ЗС значительно меньше. Так, было показано, что рекомбинантный белок ЗС не реагирует с гипериммунной сывороткой в иммуноблотинге и, следовательно, не содержит линейных эпитопов, распознаваемых антителами [34].

Для выявления антител к НСП вируса ящура разработаны различные варианты твердофазного ИФА. В непрямом варианте ИФА (н-ИФА) для детекции антител, связавшихся с неструктурным антигеном вируса ящура, применяется антивидовой (т. е. видоспецифический) конъюгат. В связи с этим н-ИФА в большинстве случаев позволяет исследовать сыворотки крови либо крупного, либо мелкого рогатого скота, либо свиней. В конкурентном варианте ИФА в качестве детектирующих антител применяются меченные ферментом поликлональные [38] или моноклональные [24] антитела против неструктурных белков вируса ящура. Этот вариант позволяет исследовать сыворотки крови всех видов животных. В 2015 г. M. Nosamani et al. предложили использовать в непрямом варианте ЗАВС-ИФА белок G, конъюгированный с пероксидазой хрена. Это позволило исследовать в н-ИФА сыворотки крови от разных видов животных [39].

Большинство описанных иммуноферментных тест-систем на основе белка ЗАВС или его составляющих отличались высокой специфичностью и чувствительностью. НСП-ИФА позволял выявлять постинфекционные антитела к вирусу ящура в течение 12–18 месяцев начиная с 7–10 дня после инфицирования [21, 23, 28, 40–42]. E. Elnekave et al. [43] удавалось обнаруживать антитела через 3 года, а W. V. Chung et al. – спустя 3,5 года после заражения [25].

Вначале применявшийся лишь в лабораториях – разработчиках метода, НСП-ИФА прошел этап коммерциализации, и к настоящему времени несколько компаний (Bionote, IDEXX Laboratories, Inc., ThermoFisher Scientific, Inc. (США), IDvet (Франция), IZSLER (Италия) и др.) производят коммерческие тест-системы для обнаружения антител к неструктурным белкам вируса ящура.

Опубликовано несколько работ, посвященных сравнительной оценке коммерческих наборов [42, 44–46]. Наиболее масштабные сличительные испытания провели E. Brocchi et al. [47]. Они сравнили шесть диагностических наборов: CHEKIT-FMD-ЗАВС (Bommeli

Diagnostics, Швейцария); UBI® FMDV NS EIA (United Biomedical, Inc., США); I-ELISA ЗАВС/EITB (PANAFTOSA, США); Ceditest® FMDV-NS ELISA (Cedi Diagnostics B.V., Нидерланды); ЗАВС trapping-ELISA (IZS-Brescia, Италия); SVANOVIR™ FMDV ЗАВС-Ab ELISA (Svanova, Швеция). С помощью каждой тест-системы была исследована 3551 проба сывороток крови крупного и мелкого рогатого скота из девяти стран. Все испытываемые наборы продемонстрировали высокую специфичность (> 96%), однако чувствительность наборов значительно варьировала. Самую высокую относительную чувствительность продемонстрировали тест-системы ЗАВС trapping-ELISA (100%), I-ELISA ЗАВС/EITB (99,6%) и Ceditest® FMDV-NS ELISA (99,6%), существенно ниже она была у UBI® FMDV NS EIA (88,8%), SVANOVIR™ FMDV ЗАВС-Ab ELISA (83,6%) и CHEKIT-FMD-ЗАВС (81,5%).

Поскольку диагностическая специфичность у всех тест-систем неабсолютна, при их использовании в серологической диагностике ящура существует вероятность получения ложноположительных результатов. Для преодоления этой проблемы рекомендуется использовать подтверждающий тест, которым может быть либо НСП-ИФА от другого разработчика, либо иммуноблотинг [8, 48].

НСП-ИФА В НАДЗОРЕ ЗА ЯЩУРОМ

В настоящее время Всемирная организация здравоохранения животных (ВОЗЖ) рекомендует НСП-ИФА как официальный метод серологической диагностики ящура [48].

Для стран, благополучных по ящуру без вакцинации, НСП-ИФА является идеальным инструментом серомониторинга и ретроспективной диагностики ящура, поскольку позволяет в одной реакции выявлять антитела ко всем семи серотипам вируса [8, 49].

Определение антител к неструктурным белкам вируса ящура является ключевым диагностическим инструментом надзора за ящуром в регионах, где эта болезнь энзоотична [50]. В ходе эрадикации ящура в Южной Америке НСП-ИФА использовался как скрининговый метод для выявления инфицированных животных в вакцинированных стадах. Неблагополучные по ящуру страны, принявшие и реализующие национальные дорожные карты по поэтапной борьбе с ящуром в рамках стратегии прогрессивного контроля за ящуром, разработанной Продовольственной и сельскохозяйственной организацией Объединенных Наций (ФАО), применяют НСП-ИФА для мониторинга циркуляции вируса [1].

Страны, претендующие на получение или восстановление утраченного статуса благополучия по ящуру, обязаны предоставлять в ВОЗЖ доосье, в котором, помимо прочего, должны быть отражены результаты тестирования животных на антитела к неструктурным белкам вируса ящура. После признания свободными от ящура страны должны продолжать серологические исследования для подтверждения статуса.

НСП-ИФА является обязательным инструментом, применяемым для контроля трансграничных перевозок живых животных и продуктов животного происхождения. Международные правила, регулирующие торговлю сельскохозяйственными животными, требуют тестировать на антитела к НСП вируса ящура рогатый скот и свиней, импортируемых из стран или зон с вакцинацией [51].

Широкое применение НСП-ИФА в диагностических и мониторинговых исследованиях ящура выявило как многочисленные достоинства метода, так и определенные ограничения, связанные с его применением. К достоинствам относятся высокая диагностическая чувствительность и специфичность, технологичность, возможность в одной реакции выявлять антитела ко всем серотипам вируса ящура.

Ограничения, связанные с применением НСП-ИФА, обусловлены не столько свойствами этого метода, сколько особенностями исследуемых образцов. Уже ранние исследования показали, что НСП-ИФА выявляет антитела у некоторых вакцинированных животных [7, 52–56]. Так, с помощью тест-системы PrioCHECK FMDV NS (ThermoFisher Scientific, Inc., США) S. P. Chen et al. установили, что все невакцинированные или однократно вакцинированные свиньи были серонегативными, однако антитела к неструктурным белкам вируса ящура были обнаружены у 16,2% многократно вакцинированных животных [54]. В исследовании G. K. Sharma et al. специфичность НСП-ИФА на невакцинированном поголовье была очень высокой и доходила до 100% [42]. Однако при анализировании тест-системой PrioCHECK FMDV NS проб, отобранных на 14-й день после вакцинации, антитела к неструктурным белкам вируса ящура были выявлены у 33% особей. Возможно, что такое большое количество животных с антителами к НСП вируса ящура объясняется тем, что вакцина индийского производства не прошла должную очистку от НСП (т. е. не соответствовала необходимым требованиям по показателям чистоты). Однако имеются и другие многочисленные данные, свидетельствующие о том, что некоторые животные после вакцинации вырабатывают антитела к неструктурным белкам вируса ящура. Так, в экспериментах T. Tekleghiorghis et al. семь из ста голов крупного рогатого скота имели антитела к неструктурным белкам вируса ящура после однократной вакцинации [57]. Необходимо отметить, что уровень таких антител был низким: при тестировании сывороток крови с помощью набора PrioCHECK FMDV NS максимальный процент ингибиции составлял 58% при позитивно-негативном пороге 50%.

В исследованиях, проведенных китайскими специалистами, количество вакцинированного крупного рогатого скота с антителами против НСП вируса ящура коррелировало с кратностью вакцинаций: среди вакцинированных до 10 раз животных серопозитивными были 2,15%, а до 15 раз – уже 5,93% [58].

Вероятно, даже очистка вакцины не позволяет полностью избавиться от неструктурных белков вируса ящура в ее составе [58, 59]. Очевидно, именно это обстоятельство заставило ВОЗЖ внести изменение в требования к противоящурным вакцинам. Если по ранее действовавшим правилам вакцина не должна была вызывать образование антител к НСП вируса ящура после трех вакцинаций, то в действующей редакции Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных ВОЗЖ допускается, чтобы одно из восьми животных, вакцинированных дважды, имело такие антитела [48].

Таким образом, при проведении диагностических и мониторинговых исследований с применением НСП-ИФА в зонах с вакцинацией необходимо учитывать возможность выявления серопозитивных животных,

у которых антитела к неструктурным белкам вируса ящура имеют поствакцинальное, а не постинфекционное происхождение.

ПРИМЕНЕНИЕ НСП-ИФА В РОССИИ

В Российской Федерации исследования по разработке ИФА для обнаружения антител к неструктурным белкам вируса ящура проводились в Федеральном центре охраны здоровья животных (ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир). Методом экспрессии в *E. coli* были получены рекомбинантные белки 3А, 3В и 3АВ вируса ящура [60]. На основе рекомбинантных антигенов был разработан непрямой вариант ИФА для выявления антител к НСП вируса ящура в сыворотках крови крупного рогатого скота [61, 62]. Несколько позднее был предложен усовершенствованный вариант 3АВ-ИФА, позволяющий тестировать сыворотки крови не только крупного, но и мелкого рогатого скота [63]. Этот метод прошел валидацию, в ходе которой было показано, что его диагностическая специфичность составляет 99,8%, а чувствительность – 96,6% [64]. Данный метод включен в область аккредитации ФГБУ «ВНИИЗЖ».

В связи с тем, что Россия принадлежит к числу стран с зонами вакцинации против ящура, для нее НСП-ИФА является обязательным инструментом серологического надзора за заболеванием. При проведении серонадзора используется диагностический алгоритм тестирования проб, рекомендованный ВОЗЖ для ящура [51], а также применяемый в медицине для диагностики некоторых особо значимых болезней, например ВИЧ-инфекции¹. Суть его заключается в использовании двух тест-систем: скрининговой и подтверждающей. Первичный скрининг проб в ФГБУ «ВНИИЗЖ» проводится с использованием 3АВ-ИФА, разработанного А. С. Яковлевой и соавт. [64], а все пробы, показавшие положительный результат, повторно тестируются с помощью коммерческого набора PrioCHECK FMDV NS. Заключение о положительном статусе какой-либо пробы делается в случае, если она показала положительный результат в обеих тест-системах. Таким образом, применение скринингового и подтверждающего тестов позволяет исключить ложные положительные результаты при проведении диагностических и мониторинговых исследований [65].

В рамках федерального мониторинга ящура в 2015–2022 гг. в ФГБУ «ВНИИЗЖ» методом НСП-ИФА было исследовано около 250 тыс. проб сыворотки крови крупного и мелкого рогатого скота из всех регионов РФ. Результаты серологических исследований вошли в качестве доказательной базы в досье, по итогам рассмотрения которых ВОЗЖ присвоила России статус страны с зоной, благополучной по ящуру без вакцинации (включает 52 субъекта РФ), и тремя зонами, свободными от ящура с вакцинацией (включают еще 16 регионов РФ)².

С целью обеспечения региональных ветеринарных лабораторий РФ современными средствами серологической диагностики ящура в ФГБУ «ВНИИЗЖ»

¹ СанПин 3.3686–21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»: утв. постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2021 № 4. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/573660140>.

² Режим доступа: <https://www.woah.org/en/disease/foot-and-mouth-disease/#ui-id-2>.

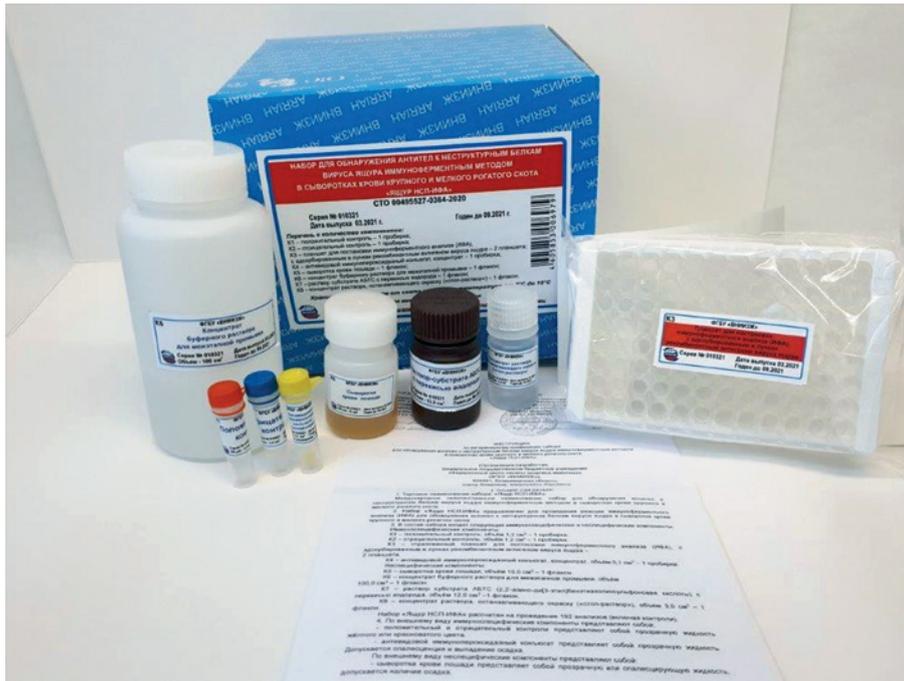


Рис. 2. Набор для выявления антител к неструктурным белкам вируса ящура «Ящур НСП-ИФА» производства ФГБУ «ВНИИЗЖ»

Fig. 2. FMD-NSP-ELISA test-kit for detection of antibodies against FMD virus non-structural proteins produced by the FGBI "ARRIAH"

организовано производство коммерческого набора для выявления антител к неструктурным белкам вируса ящура «Ящур НСП-ИФА» (рис. 2)³.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружение антител к неструктурным белкам вируса ящура является важным инструментом надзора за заболеванием. Способность НСП-тестов определять инфекцию независимо от серотипа вируса определяет их востребованность в странах, благополучных по ящуру без вакцинации, а возможность с помощью НСП-ИФА выявлять инфекцию у вакцинированных животных обеспечивает его широкое применение в странах или зонах с вакцинацией. Однако необходимо учитывать, что дифференциация вакцинированных и инфицированных животных с помощью НСП-тестов возможна только при условии применения высокоочищенных противоящурных вакцин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Jamal S. M., Belsham G. J. Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Vet. Res.* 2013; 44 (1):116. DOI: 10.1186/1297-9716-44-116.
- Grubman M. J., Baxt B. Foot-and-mouth disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17 (2): 465–493. DOI: 10.1128/CMR.17.2.465-493.2004.
- Samuel A. R., Knowles N. J. Foot-and-mouth disease type O viruses exhibit genetically and geographically distinct evolutionary lineages (topotypes). *J. Gen. Virol.* 2001; 82 (3): 609–621. DOI: 10.1099/0022-1317-82-3-609.
- Carrillo C., Tulman E. R., Delhon G., Lu Z., Carreno A., Vagnozzi A., et al. Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 2005; 79 (10): 6487–6504. DOI: 10.1128/JVI.79.10.6487-6504.2005.
- Hutber A. M., Kitching R. P., Conway D. A. Control of foot-and-mouth disease through vaccination and the isolation of infected animals. *Trop. Anim. Health. Prod.* 1998; 30 (4): 217–227. DOI: 10.1023/a:1005071027414.
- Arzt J., Belsham G. J., Lohse L., Botner A., Stenfeldt C. Transmission of foot-and-mouth disease from persistently infected carrier cattle to naive

cattle via transfer of oropharyngeal fluid. *mSphere.* 2018; 3 (5):e00365–18. DOI: 10.1128/mSphere.00365-18.

7. Crowther J. R. Review of the developments in the detection of antibodies to non-structural proteins of foot and mouth disease virus. *In: The use of non-structural proteins of foot and mouth disease virus (FMDV) to differentiate between vaccinated and infected animals.* Vienna: IAEA; 2007; 3–46. Режим доступа: https://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/te_1546_web.pdf. (дата обращения: 18.01.2023).

8. Tewari A., Ambrose H., Parekh K., Inoue T., Guitian J., Nardo A. D., et al. Development and validation of confirmatory foot-and-mouth disease virus antibody ELISAs to identify infected animals in vaccinated populations. *Viruses.* 2021; 13 (5):914. DOI: 10.3390/v13050914.

9. Clavijo A., Wright P., Kitching P. Developments in diagnostic techniques for differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease. *Vet. J.* 2004; 167 (1): 9–22. DOI: 10.1016/s1090-0233(03)00087-x.

10. Yadin H., Brenner J., Chai D., Oved Z., Hadany Y., Kusak A., Haimovich M. The NSP immune response of vaccinated animals after in-field exposure to FMDV. *Vaccine.* 2007; 25 (49): 8298–8305. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.09.071.

11. Gao Y., Sun S. Q., Guo H. C. Biological function of foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements. *Virology.* 2016; 13:107. DOI: 10.1186/s12985-016-0561-z.

12. Doel T. R. FMD vaccines. *Virus Res.* 2003; 91 (1): 81–99. DOI: 10.1016/s0168-1702(02)00261-7.

13. Lubroth J., Grubman M. J., Burrage T. G., Newman J. F., Brown F. Absence of protein 2C from clarified foot-and-mouth disease virus vaccines provides the basis for distinguishing convalescent from vaccinated animals. *Vaccine.* 1996; 14 (5): 419–427. DOI: 10.1016/0264-410x(95)00172-w.

14. McVicar J. W., Suttmoller P. Foot-and-mouth disease: the agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus-infection-associated (via) antigen as a tool for epizootologic surveys. *Am. J. Epidemiol.* 1970; 92 (4): 273–278. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a121207.

15. Bergmann I. E., de Mello P. A., Neitzert E., Beck E., Gomes I. Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. *Am. J. Vet. Res.* 1993; 54 (6): 825–831. PMID: 8391765.

16. Ma L. N., Zhang J., Chen H. T., Zhou J. H., Ding Y. Z., Liu Y. S. An overview on ELISA techniques for FMD. *Virology.* 2011; 8:419. DOI: 10.1186/1743-422X-8-419.

17. Shen F., Chen P. D., Walfield A. M., Ye J., House J., Brown F., Wang C. Y. Differentiation of convalescent animals from those vaccinated against foot-and-mouth disease by a peptide ELISA. *Vaccine.* 1999; 17 (23–24): 3039–3049. DOI: 10.1016/s0264-410x(99)00148-6.

³ Режим доступа: <https://shop.arriah.ru/catalog/diagnostikum/nabor-dlya-obnaruzheniya-antitel-k-nestrukturnym-belkam-virusa-yashchura-immunofermentnyy-metodom-v->

18. Oem J. K., Kye S. J., Lee K. N., Park J. H., Kim Y. J., Song H. J., Yeh M. Development of synthetic peptide ELISA based on nonstructural protein 2C of foot and mouth disease virus. *J. Vet. Sci.* 2005; 6 (4): 317–325. PMID: 16293996.
19. Crowther J. R. The use of non-structural (NS) antigens of FMD virus to assess antibodies in vaccinated and infected livestock. In: *Foot-and-mouth disease: control strategies. Symposium Proceedings (2–5 June 2002)*. Lyons, France: 2002; 377.
20. Rodríguez A., Dopazo J., Sáiz J. C., Sobrino F. Immunogenicity of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus: differences between infected and vaccinated swine. *Arch. Virol.* 1994; 136 (1–2): 123–131. DOI: 10.1007/BF01538822.
21. De Diego M., Brocchi E., Mackay D., De Simone F. The non-structural polyprotein 3ABC of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. *Arch. Virol.* 1997; 142 (10): 2021–2033. DOI: 10.1007/s007050050219.
22. Foster M., Cook A., Cedillo L., Parkhouse R. M. Serological and cellular immune responses to non-structural proteins in animals infected with FMDV. *Vet. Q.* 1998; 20 (Suppl. 2): S28–30. DOI: 10.1080/01652176.1998.9694960.
23. Mackay D. K., Forsyth M. A., Davies P. R., Berlinzani A., Belsham G. J., Flint M., Ryan M. D. Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant, non-structural proteins in ELISA. *Vaccine.* 1998; 16 (5): 446–459. DOI: 10.1016/s0264-410x(97)00227-2.
24. Sørensen K. J., de Stricker K., Dyrting K. C., Grazioli S., Haas B. Differentiation of foot-and-mouth disease virus infected animals from vaccinated animals using a blocking ELISA based on baculovirus expressed FMDV 3ABC antigen and a 3ABC monoclonal antibody. *Arch. Virol.* 2005; 150 (4): 805–814. DOI: 10.1007/s00705-004-0455-z.
25. Chung W. B., Sorensen K. J., Liao P. C., Yang P. C., Jong M. H. Differentiation of foot-and-mouth disease virus-infected from vaccinated pigs by enzyme-linked immunosorbent assay using nonstructural protein 3AB as the antigen and application to an eradication program. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40 (8): 2843–2848. DOI: 10.1128/JCM.40.8.2843-2848.2002.
26. Kweon C. H., Ko Y. J., Kim W. I., Lee S. Y., Nah J. J., Lee K. N., et al. Development of a foot-and-mouth disease NSP ELISA and its comparison with differential diagnostic methods. *Vaccine.* 2003; 21 (13–14): 1409–1414. DOI: 10.1016/s0264-410x(02)00684-9.
27. Meyer R. F., Babcock G. D., Newman J. F., Burrage T. G., Toohey K., Lubroth J., Brown F. Baculovirus expressed 2C of foot-and-mouth disease virus has the potential for differentiating convalescent from vaccinated animals. *J. Virol. Methods.* 1997; 65 (1): 33–43. DOI: 10.1016/s0166-0934(96)02165-9.
28. Biswal J. K., Jena S., Mohapatra J. K., Bisht P., Pattnaik B. Detection of antibodies specific for foot-and-mouth disease virus infection using indirect ELISA based on recombinant nonstructural protein 2B. *Arch. Virol.* 2014; 159 (7): 1641–1650. DOI: 10.1007/s00705-013-1973-3.
29. Biswal J. K., Ranjan R., Pattnaik B. Diagnostic application of recombinant non-structural protein 3A to detect antibodies induced by foot-and-mouth disease virus infection. *Biologicals.* 2016; 44 (3): 157–162. DOI: 10.1016/j.biologicals.2016.02.004.
30. Mahajan S., Mohapatra J. K., Pandey L. K., Sharma G. K., Pattnaik B. Truncated recombinant non-structural protein 2C-based indirect ELISA for FMD sero-surveillance. *J. Virol. Methods.* 2013; 193 (2): 405–414. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.07.003.
31. Mohapatra A. K., Mohapatra J. K., Pandey L. K., Sanyal A., Pattnaik B. Diagnostic potential of recombinant nonstructural protein 3B to detect antibodies induced by foot-and-mouth disease virus infection in bovines. *Arch. Virol.* 2014; 159 (9): 2359–2369. DOI: 10.1007/s00705-014-2089-0.
32. He C., Wang H., Wei H., Yan Y., Zhao T., Hu X., et al. A recombinant truncated FMDV 3AB protein used to better distinguish between infected and vaccinated cattle. *Vaccine.* 2010; 28 (19): 3435–3439. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.02.072.
33. Bergmann I. E., Malirat V., Neitzert E., Beck E., Panizzutti N., Sánchez C., Falczuk A. Improvement of a serodiagnostic strategy for foot-and-mouth disease virus surveillance in cattle under systematic vaccination: a combined system of an indirect ELISA-3ABC with an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay. *Arch. Virol.* 2000; 145 (3): 473–489. DOI: 10.1007/s007050050040.
34. Sun T., Lu P., Wang X. Localization of infection-related epitopes on the non-structural protein 3ABC of foot-and-mouth disease virus and the application of tandem epitopes. *J. Virol. Methods.* 2004; 119 (2): 79–86. DOI: 10.1016/j.jviromet.2004.02.016.
35. Lu Z., Cao Y., Guo J., Qi S., Li D., Zhang Q., et al. Development and validation of a 3ABC indirect ELISA for differentiation of foot-and-mouth disease virus infected from vaccinated animals. *Vet. Microbiol.* 2007; 125 (1–2): 157–169. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.05.017.
36. Zia M. A., Dobson S. J., Rowlands D. J., Stonehouse N. J., Shah M. S., Habib M. Development of an ELISA to distinguish between foot-and-mouth disease virus infected and vaccinated animals utilising the viral non-structural protein 3ABC. *J. Med. Microbiol.* 2022; 71 (4). DOI: 10.1099/jmm.0.001516.
37. Brocchi E., De Diego M. I., Berlinzani A., Gamba D., De Simone F. Diagnostic potential of Mab-based ELISAs for antibodies to non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus to differentiate infection from vaccination. *Vet. Q.* 1998; 20 (Suppl. 2): S20–24. PMID: 9652058.
38. Sørensen K. J., Madsen K. G., Madsen E. S., Salt J. S., Nqindi J., Mackay D. K. Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus. *Arch. Virol.* 1998; 143 (8): 1461–1476. DOI: 10.1007/s007050050390.
39. Hosamani M., Basagoudanavar S. H., Tamil Selvan R. P., Das V., Ngan-gom P., Sreenivasa B. P., et al. A multi-species indirect ELISA for detection of non-structural protein 3ABC specific antibodies to foot-and-mouth disease virus. *Arch. Virol.* 2015; 160 (4): 937–944. DOI: 10.1007/s00705-015-2339-9.
40. Nanni M., Alegre M., Compaired D., Taboga O., Fondevila N. Novel purification method for recombinant 3AB1 nonstructural protein of foot-and-mouth disease virus for use in differentiation between infected and vaccinated animals. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2005; 17 (3): 248–251. DOI: 10.1177/104063870501700306.
41. Silberstein E., Kaplan G., Taboga O., Duffy S., Palma E. Foot-and-mouth disease virus-infected but not vaccinated cattle develop antibodies against recombinant 3AB1 nonstructural protein. *Arch. Virol.* 1997; 142 (4): 795–805. DOI: 10.1007/s007050050119.
42. Sharma G. K., Mohapatra J. K., Mahajan S., Matura R., Subramaniam S., Pattnaik B. Comparative evaluation of non-structural protein-antibody detecting ELISAs for foot-and-mouth disease sero-surveillance under intensive vaccination. *J. Virol. Methods.* 2014; 207: 22–28. DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.06.022.
43. Enekave E., Shilo H., Gelman B., Klement E. The longevity of anti NSP antibodies and the sensitivity of a 3ABC ELISA – a 3 years follow up of repeatedly vaccinated dairy cattle infected by foot and mouth disease virus. *Vet. Microbiol.* 2015; 178 (1–2): 14–18. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.04.003.
44. Bronsvort B. M., Sørensen K. J., Anderson J., Corteyn A., Tanya V. N., Kitching R. P., Morgan K. L. Comparison of two 3ABC enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of multiple-serotype foot-and-mouth disease in a cattle population in an area of endemicity. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42 (5): 2108–2114. DOI: 10.1128/JCM.42.5.2108-2114.2004.
45. Moonen P., van der Linde E., Chénard G., Dekker A. Comparable sensitivity and specificity in three commercially available ELISAs to differentiate between cattle infected with or vaccinated against foot-and-mouth disease virus. *Vet. Microbiol.* 2004; 99 (2): 93–101. DOI: 10.1016/j.vetmic.2003.12.003.
46. Lee F., Lin Y. L., Jong M. H. Comparison of ELISA for the detection of porcine serum antibodies to non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol. Methods.* 2004; 116 (2): 155–159. DOI: 10.1016/j.jviromet.2003.11.004.
47. Brocchi E., Bergmann I. E., Dekker A., Paton D. J., Sammin D. J., Greiner M., et al. Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine.* 2006; 24 (47–48): 6966–6979. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.04.050.
48. Foot and mouth disease (infection with foot and mouth disease virus). In: *WOAH. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 3.1.8.* Режим доступа: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_FMD.pdf.
49. Paton D. J., Ferris N. P., Hutchings G. H., Li Y., Swabey K., Keel P., et al. Investigations into the cause of foot-and-mouth disease virus seropositive small ruminants in Cyprus during 2007. *Transbound. Emerg. Dis.* 2009; 56 (8): 321–328. DOI: 10.1111/j.1865-1682.2009.01088.x.
50. Chitray M., Grazioli S., Willems T., Tshabalala T., De Vleeschouwer A., Esterhuysen J. J., et al. Development and validation of a foot-and-mouth disease virus SAT serotype-specific 3ABC assay to differentiate infected from vaccinated animals. *J. Virol. Methods.* 2018; 255: 44–51. DOI: 10.1016/j.jviromet.2018.02.006.
51. WOAH. Terrestrial Animal Health Code. Режим доступа: <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access>.
52. Armstrong R. M., Cox S. J., Aggarwal N., Mackay D. J., Davies P. R., Hamblin P. A., et al. Detection of antibody to the foot-and-mouth disease virus (FMDV) non-structural polyprotein 3ABC in sheep by ELISA. *J. Virol. Methods.* 2005; 125 (2): 153–163. DOI: 10.1016/j.jviromet.2005.01.012.
53. Robiolo B., Seki C., Fondevilla N., Grigera P., Scodeller E., Perio-lo O., et al. Analysis of the immune response to FMDV structural and non-structural proteins in cattle in Argentina by the combined use of liquid phase and 3ABC-ELISA tests. *Vaccine.* 2006; 24 (7): 997–1008. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.08.071.
54. Chen S. P., Ellis T. M., Lee M. C., Cheng I. C., Yang P. C., Lin Y. L., et al. Comparison of sensitivity and specificity in three commercial foot-and-mouth disease virus non-structural protein ELISA kits with swine sera in Taiwan. *Vet. Microbiol.* 2007; 119 (2–4): 164–172. DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.09.013.

55. Mohapatra J. K., Pandey L. K., Sanyal A., Pattnaik B. Recombinant non-structural polyprotein 3AB-based serodiagnostic strategy for FMD surveillance in bovines irrespective of vaccination. *J. Virol. Methods*. 2011; 177 (2): 184–192. DOI: 10.1016/j.jviromet.2011.08.006.
56. Lee F., Jong M. H., Yang D. W. Presence of antibodies to non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus in repeatedly vaccinated cattle. *Vet. Microbiol.* 2006; 115 (1–3): 14–20. DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.12.017.
57. Tekleghiorghis T., Weerdmeester K., van Hemert-Kluitenberg F., Moormann R. J., Dekker A. Comparison of test methodologies for foot-and-mouth disease virus serotype A vaccine matching. *Clin. Vaccine. Immunol.* 2014; 21 (5): 674–683. DOI: 10.1128/CVI.00034-14.
58. Liu Z. Z., Zhao F. R., Gao S. D., Shao J. J., Zhang Y. G., Chang H. Y. Development of a chemiluminescence immunoassay using recombinant non-structural epitope-based proteins to accurately differentiate foot-and-mouth disease virus-infected and vaccinated bovines. *Transbound. Emerg. Dis.* 2018; 65 (2): 338–344. DOI: 10.1111/tbed.12811.
59. Barnett P. V., Geale D. W., Clarke G., Davis J., Kasari T. R. A review of OIE country status recovery using vaccinate-to-live versus vaccinate-to-die foot-and-mouth disease response policies I: benefits of higher potency vaccines and associated NSP DIVA test systems in post-outbreak surveillance. *Transbound. Emerg. Dis.* 2015; 62 (4): 367–387. DOI: 10.1111/tbed.12166.
60. Яковлева А. С., Каньшина А. В., Щербakov А. В. Экспрессия в *E. coli* рекомбинантных белков 3А, 3В и 3АВ вируса ящура. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. 2005; 3: 105–114. EDN: UNWYYB.
- Yakovleva A. S., Kanshina A. V., Scherbakov A. V. Expression of recombinant nonstructural proteins 3A, 3B and 3AB of foot-and-mouth disease virus in *E. coli*. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2005; 3: 105–114. EDN: UNWYYB. (in Russ.)
61. Яковлева А. С., Щербakov А. В., Каньшина А. В., Мудрак Н. С., Фомина Т. А. Рекомбинантные неструктурные белки 3А, 3В и 3АВ вируса ящура: использование для дифференциации вакцинированного и инфицированного крупного рогатого скота. *Молекулярная биология*. 2006; 40 (1): 165–171. EDN: HSWPVB.
- Yakovleva A. S., Shcherbakov A. V., Kanshina A. V., Mudrak N. S., Fomina T. A. Recombinant non-structural 3A, 3B and 3AB proteins of foot-and-mouth disease virus: use in indirect ELISA for differentiation of vaccinated and infected cattle. *Mol. Biol.* 2006; 40 (1): 146–151. DOI: 10.1134/S0026893306010195.
62. Яковлева А. С., Каньшина А. В., Щербakov А. В., Мудрак Н. С., Фомина Т. А. Использование рекомбинантных белков 3А, 3В и 3АВ вирусов ящура в непрямом варианте ИФА для дифференциации инфицированного и вакцинированного крупного рогатого скота. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. 2005; 3: 115–126. EDN: UNWYYL.
- Yakovleva A. S., Kanshina A. V., Scherbakov A. V., Mudrak N. S., Fomina T. A. Development of an indirect ELISA based on *E. coli* expressed 3A, 3B and 3AB nonstructural proteins of FMDV to differentiate between infected and vaccinated cattle. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2005; 3: 115–126. EDN: UNWYYL. (in Russ.)
63. Яковлева А., Каньшина А., Щербakov А. В. Development of indirect ELISA for detection of antibodies to foot-and-mouth disease virus nonstructural proteins. In: *The Global Control of FMD – Tool, Ideas and Ideals: Book and Abstr. Europ. Commis. Control FMD*. FAO; 2008; 80.
64. Яковлева А. С., Каньшина А. В., Щербakov А. В., Орлова Е. С. Разработка и валидация тест-системы 3АВ-ИФА для обнаружения антител к неструктурным белкам вируса ящура в сыворотках крови крупного и мелкого рогатого скота. *Ветеринария сегодня*. 2015; (4): 36–42. EDN: VODNXP.
- Yakovleva A. S., Kanshina A. V., Scherbakov A. V., Orlova Ye. S. Development and validation of 3AB-ELISA test-system for detection of antibodies to FMD virus nonstructural proteins in blood sera from cattle and small ruminants. *Veterinary Science Today*. 2015; (4): 36–42. EDN: VODNXP. (in Russ.)
65. Каньшина А. В., Яковлева А. С., Орлова Е. С., Щербakov А. В. Серомониторинг ящура. *Молекулярная диагностика: сборник трудов X Юбилейной международной научно-практической конференции (Москва, 9–11 ноября 2021 г.)*. Тамбов: ООО фирма «Юлис»; 2021; 2: 349–350. EDN: FEDYZQ.
- Kanshina A. V., Yakovleva A. S., Orlova Y. S., Scherbakov A. V. Seromonitoring yashchura = Seromonitoring for foot-and-mouth disease. *Molekulyarnaya diagnostika: sbornik nauchnykh trudov X Yubileinoi mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (Moskva, 9–11 noyabrya 2021 g.) = Molecular diagnosis: Proceedings of the X Anniversary International Scientific and Practical Conference (Moscow, 9–11 2021)*. Tambov: ООО firma “Yulis”; 2021; 2: 349–350. EDN: FEDYZQ.

Поступила в редакцию / Received 19.04.2023

Поступила после рецензирования / Revised 15.05.2023

Принята к публикации / Accepted 19.06.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Яковлева Анастасия Сергеевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории по особо опасным болезням ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-9211-9110>, e-mail: yakovleva_as@arriah.ru.

Щербakov Алексей Владимирович, кандидат биологических наук, заведующий референтной лабораторией по особо опасным болезням ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-8326-4201>, e-mail: ascherbakov@arriah.ru.

Anastasia S. Yakovleva, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Reference Laboratory for Highly Dangerous Diseases, FGBI “ARRIAH”, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-9211-9110>, e-mail: yakovleva_as@arriah.ru.

Aleksey V. Scherbakov, Candidate of Science (Biology), Head of Reference Laboratory for highly dangerous diseases, FGBI “ARRIAH”, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-8326-4201>, e-mail: ascherbakov@arriah.ru.



Современные подходы к разработке тест-систем на основе количественной ПЦР в режиме реального времени

М. И. Доронин, Д. В. Михалишин, А. В. Спрыгин, А. Мазлум, Т. В. Жбанова, К. Н. Груздев, Е. В. Чернышова
ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

РЕЗЮМЕ

В настоящее время в различных областях молекулярной биологии применяется основанная на флуоресцентной детекции количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, которая является передовой технологией генной диагностики. Практическая простота, а также сочетание высокой скорости, чувствительности и специфичности сделали возможным использование данного анализа для количественного определения нуклеиновых кислот. В статье представлены общие сведения и отражены рекомендуемые правила для разработки методик количественного ПЦР-анализа в режиме реального времени. Материалы публикации нацелены на предоставление исследователям и рецензентам необходимых требований, которых следует придерживаться, чтобы обеспечить высокую точность, надежность и прозрачность экспериментов, правильную интерпретацию и повторяемость результатов анализа. Представлены современные подходы, которые позволяют получать надежные и достоверные результаты, проводимые разными операторами, в разное время и в разных лабораториях. Приведены основные требования, предъявляемые к применяемым реагентам, перечням нуклеотидных последовательностей и методам проведения валидационного анализа. В целом в представленной публикации отражена информация для достижения трех конечных целей работы: предоставить авторам широкий арсенал инструментов и требований для разработки методик на основе количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени; дать возможность рецензентам и редакторам оценивать качество представленных материалов статей и методических рекомендаций/указаний в соответствии с требуемыми критериями; получать однородные, сопоставимые и надежные результаты исследований, выполненных с помощью данного метода.

Ключевые слова: обзор, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, обратная транскрипция, требования к тест-системам, валидация, олигонуклеотидные праймеры и зонды, эффективность реакции амплификации

Благодарности: Данная работа выполнена за счет средств гранта Министерства образования и науки России в рамках реализации задач Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 гг. по соглашению № 075-15-2021-1054.

Для цитирования: Доронин М. И., Михалишин Д. В., Спрыгин А. В., Мазлум А., Жбанова Т. В., Груздев К. Н., Чернышова Е. В. Современные подходы к разработке тест-систем на основе количественной ПЦР в режиме реального времени. *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (3): 197–207. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-197-207.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Доронин Максим Игоревич, доктор биологических наук, заведующий сектором лаборатории профилактики ящура, ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьеvec, e-mail: doronin@arriah.ru.

Current approaches to development of real-time qPCR test-kits

M. I. Doronin, D. V. Mikhailishin, A. V. Sprygin, A. Mazloum, T. V. Zhanova, K. N. Gruzdev, E. V. Chernyshova
FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

SUMMARY

Currently fluorescent quantitative real-time polymerase chain reaction, which is a cutting-edge technology in genetic diagnosis, is used in different areas of molecular biology. Practical advantage of simplicity as well as combination of high speed, sensitivity and specificity made it possible to use this analysis for nucleic acid quantitation. The paper presents general information and recommended rules for the development of real-time qPCR. The publication is aimed to acquaint the researchers and reviewers with necessary requirements to be followed in order to ensure high accuracy, reliability and transparency of the experiments, correct interpretation and repeatability of the test results. Current approaches are described that allow obtaining reliable and consistent results by different operators, at different times and in different laboratories. Basic requirements for reagents used, nucleotide sequences and validation methods are given. In general, the publication gives the information needed to achieve three ultimate goals: to provide the authors with a broad range of tools and requirements for the development of real-time qPCR based-techniques; to give the possibility to the reviewers and editors of assessing the quality of articles and guidelines/instructions in accordance with the required criteria; to obtain consistent and reliable results of tests performed using this method.

Keywords: review, real-time polymerase chain reaction, reverse transcription, requirements for test-kits, validation, oligonucleotide primers and probes, performance of amplification reaction

Acknowledgements: This work was supported by the grant of the Ministry of Education and Science of Russia within the Federal Scientific and Technical Program for the Development of Genetic Technologies for 2019–2027 under Agreement No. 075-15-2021-1054.

For citation: Doronin M. I., Mikhailishin D. V., Sprygin A. V., Mazloum A., Zhanova T. V., Gruzdev K. N., Chernyshova E. V. Current approaches to development of real-time qPCR test-kits. *Veterinary Science Today*. 2023; 12 (3): 197–207. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-197-207.

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

For correspondence: Maksim I. Doronin, Doctor of Science (Biology), Head of Sector, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: doronin@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

В различных областях молекулярной биологии применяется основанная на флуоресцентной детекции количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ, qPCR), которая является передовой технологией генной диагностики [1–3]. Практическая простота, а также сочетание высокой скорости, чувствительности и специфичности сделали возможным применение данного анализа для количественного определения нуклеиновых кислот [4–6]. В последние годы было разработано множество диагностических тест-систем на основе количественной ПЦР-РВ, включая системы для определения титра инфекционной активности возбудителей заболеваний, иммуногенных компонентов, содержащих геном возбудителя, идентификации трансгенов в генетически модифицированных пищевых продуктах, оценки риска рецидива рака и др. [4–15].

В настоящее время отсутствует единое представление относительно того, как наилучшим образом проводить разработку методик количественной ПЦР для осуществления экспериментов с последующим анализом данных. Проблема усугубляется отсутствием четко выверенных требований для этих разработок, что мешает исследователю критически оценить качество получаемых результатов [16–18]. Так, при разработке тест-систем на основе количественной ПЦР-РВ некоторые авторы допускают ряд технических ошибок, часть из которых представлена в таблице 1.

Следовательно, существует реальная опасность искажения получаемых данных с применением методик количественной ПЦР-РВ [19, 20]. Кроме того, при разработке тест-систем часто опускается информация о сборе и обработке образцов, качестве и целостности РНК, деталях постановки реакции обратной транскрипции, эффективности ПЦР и параметрах анализа, а нормализация количественных данных для образцов обычно проводится по отдельным эталонным генам без надлежащего обоснования [21]. О проблеме стандартизации разработки методик количественной ПЦР-РВ заявлено во многих научных публикациях [19–23], следовательно, данная задача является актуальной в настоящее время.

Существует ряд научных работ, в частности руководство по разработке методик количественной ПЦР-РВ, в которых отражены основные требования к разработкам таких методик [24–26].

ПЦР-технологии в настоящее время в целом направлены на достижение исследовательских и диагностических целей [23]. При проведении научных исследований анализ обычно характеризуется низкой пропускной способностью и разнообразием типов образцов [25]. Основные параметры, которые необходимо учитывать, относятся к аналитической чувствительности и специфичности анализа [20, 26].

При использовании ПЦР для решения диагностических задач обычно анализируется ограниченное число целевых объектов, при этом требуется наличие высокопроизводительных протоколов, ориентированных только на несколько типов образцов [22]. Характеристика теста включает сведения об аналитической чувствительности и специфичности, то есть как часто анализ дает положительный результат при наличии мишени и как часто он является отрицательным при условии отсутствия целевого участка нуклеиновой кислоты [19, 24]. Кроме того, требуется проводить исследования точности, повторяемости и воспроизводимости анализа (табл. 2).

Целью данной работы является предоставление исследователям и рецензентам общих современных требований, которых следует придерживаться при разработке методик на основе количественной ПЦР-РВ, чтобы обеспечить высокую точность и надежность, прозрачность экспериментов, правильную интерпретацию и повторяемость результатов анализа.

Таблица 1

Возможные технические ошибки при разработке методики количественной ПЦР-РВ и их негативные последствия

Table 1
Possible technical errors that affect real-time qPCR assay performance and their negative consequences

№ п/п	Возможные технические ошибки	Негативные последствия
1	Неправильное хранение образцов, погрешности в процессе пробоподготовки и плохое качество нуклеиновых кислот	Существенные вариации результатов
2	Выбор недостаточно подходящих олигонуклеотидных праймеров и зондов для реакции	Неэффективная и меньшая производительность анализа
3	Неправильно проведенный статистический анализ	Получаемые результаты могут ввести в заблуждение

СТАНДАРТИЗАЦИЯ НЕКОТОРЫХ ТЕРМИНОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ПРИ РАЗРАБОТКЕ МЕТОДИК НА ОСНОВЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР-РВ

В соответствии с предложениями, которые содержатся на ресурсе Real-time PCR Data Markup Language (RDML)¹ [27], требуется внести некоторые коррективы в употребление общепринятых терминов, применяемых при разработке методик на основе ПЦР, в частности:

– зонды TaqMan следует называть зондами для гидролиза;

– употребление термина «FRET-зонд» (флуоресцентный резонансный перенос энергии), относящегося к общему механизму, в котором излучение/тушение зависит от взаимодействия между состояниями электронного возбуждения двух молекул флуоресцентного красителя;

– зонды типа Light Cyler следует называть зондами двойной гибридизации [25];

– номенклатура, описывающая цикл ПЦР, который используется для количественного определения содержания нуклеиновых кислот, противоречива, а именно: в литературе используются понятия «пороговый цикл» (C_t – cycle threshold), «верхний максимум графиков второй производной» (C_p – crossing point) и «точка отсчета» (TOP – take-off point). Для унифицирования терминов многими авторами используется понятие «цикл количественной оценки» (C_q – quantification cycle) [28, 29].

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К РАЗЛИЧНЫМ ЭТАПАМ АНАЛИЗА

Отбор образцов биологического материала и их хранение. Отбор образцов представляет собой важный источник экспериментальной изменчивости, поскольку РНК легко повреждается. По данным P. Micke et al. [30], свежий биологический материал можно хранить на льду без существенного влияния на качество и содержание РНК, однако этот подход нельзя применять повсеместно. В ПЦР-протоколах важно подробно указывать всю историю получения и транспортировки биоматериала [31].

Экстрагирование нуклеиновых кислот. Экстракция нуклеиновых кислот также является серьезным этапом манипуляций в комплексе операций, входящих в состав общей методики на основе количественной ПЦР-РВ [32, 33]. Эффективность экстракции определяется степенью гомогенизации и типом образца (гомогенат тканей, культуральная суспензия, слюна, кровь и др.), плотностью мишени, физиологическим статусом (например, здоровый, злокачественный или некротический), генетической сложностью и количеством обработанной биомассы [27, 34–36].

Требуется предоставлять подробную информацию о способе экстракции нуклеиновых кислот и методах, используемых для измерения концентрации нуклеиновых кислот и оценки их качества. Такие детали особенно важны для РНК, выделенной из свежемороженого биоматериала, поскольку различия в процедурах подготовки тканей оказывают существенное влияние как на концентрацию РНК, так и на их качество [37–39].

¹ Real-time PCR Data Markup Language. Режим доступа: <https://rdml.org>.

Таблица 2
Параметры, предъявляемые для валидации методик на основе количественной ПЦР-РВ

Table 2
Parameters required for the validation of real-time qPCR-based methods

Область исследований	Характеристика анализа	Основные параметры валидационной оценки
Научные испытания	1. Низкая пропускная способность 2. Множество различных типов образцов	1. Аналитическая чувствительность 2. Аналитическая специфичность
Диагностические исследования	1. Анализ ограниченного числа целевых объектов 2. Наличие высокопроизводительных протоколов, ориентированных только на несколько типов образцов	1. Аналитическая чувствительность 2. Аналитическая специфичность 3. Точность 4. Повторяемость 5. Воспроизводимость

Контроль качества экстрактов РНК

Количественное определение РНК в экстрактах.

Количественное определение РНК в элюатах важно для проведения корректного анализа нуклеиновых кислот на этапе реакций обратной транскрипции и амплификации.

Существует несколько групп методов количественного анализа РНК в получаемых элюатах, а именно:

1) спектрофотометрический анализ с применением различных спектрофотометров;

2) микрофлюидный анализ, например, с помощью биоанализаторов компаний Agilent Technologies, Inc. (США), Bio-Rad Laboratories, Inc. (США) и др.;

3) капиллярный гель-электрофорез, например, с использованием автоматической станции QIAxcel компании Qiagen (Германия) и др.;

4) флуоресцентная детекция (Ambion, RiboGreen, Thermo Fisher Scientific, Inc., США, и др.) [14, 23, 40].

Следует отметить, что молекулы РНК заметно деградируют *in vivo* из-за естественной регуляции мРНК в ответ на различные влияния факторов окружающей среды [41, 42]. Так, даже высококачественные элюаты РНК могут демонстрировать дифференциальную деградацию отдельных молекул, что исследователю сложно контролировать.

Процедура определения степени чистоты элюата РНК.

Для определения степени чистоты полученных элюатов проводят спектральное исследование экстрактов. Измерения спектральной поглощающей способности образцов осуществляют при длине волны 205–325 нм и температуре 20–22 °С. В экстрактах РНК оценивают содержание остатков фосфолипидов, полисахаридов и гуанидин изотиоцианата, карболовой кислоты, полипептидов и крупных взвешенных частиц, определяя значения оптической плотности (OD – optical density) при 205, 235, 270, 280 и 320 нм соответственно. Наибольшая адсорбция для РНК должна отмечаться при длине волны, равной 260 нм [40]. Элюат РНК считают свободным от примесей белка и карболовой кислоты, если OD_{260}/OD_{280} (коэффициент экстинкции R_1) находится в пределах 1,8–2,2 и оптимально составляет примерно 2,0. Более низкие значения R_1 указывают на наличие ДНК, белка и остатков фенольных соединений в экстракте. Более высокие значения коэффициента R_1 свидетельствуют о деградации РНК и наличии

свободных рибонуклеотидов. Экстракт молекул РНК считают свободным от полисахаридов, если отношение OD_{260}/OD_{235} (коэффициент экстинкции R_2) приближено к значению 2,000 [40, 43, 44]. При замещении 1% РНК на полисахаридные составляющие R_2 снижается на 0,002. Значения коэффициента R_2 больше 2,000 могут указывать на деградацию молекул РНК. Отсутствие взвешенных частиц в экстракте подтверждается, если оптическая плотность при длине волны 320 нм приближена к нулевому значению.

Важно проводить анализ степени загрязнения элюата РНК геномной ДНК, а также зафиксировать в протоколе исследования пороговые критерии отсека для допустимых количеств такого загрязнения. Требуется отражать информацию о том, был ли экстракт РНК обработан ДНКазой, а также зафиксировать результаты сравнения циклов количественной оценки (C_q), полученных с положительным контролем и контролем без осуществления реакции обратной транскрипции для каждой нуклеиновой кислоты – мишени [20].

Определение целостности РНК в элюате. Для оценки целостности РНК и отсутствия контаминации ДНК проводят горизонтальный гель-электрофорез денатурированной РНК, по итогам которого детектируют четко различимый бэнд молекул нуклеиновой кислоты без наличия выраженных посторонних полинуклеотидных фрагментов [45]. Электрофорез проводят в тонком 0,5%-м геле агарозы, приготовленном на основе агарозы Е, 1× электродного буфера, свободного от РНКаз, в градиенте напряженности 1–2 В/см геля в течение 45 мин. Для индикации РНК после электрофореза гель окрашивают раствором красителя с концентрацией бромистого этидия 0,4 мкг/мл в 25 мМ трис-НСl (рН 9,0) в течение 50–60 мин. Детекцию РНК-бэндов проводят в ультрафиолетовом трансиллюминаторе [45, 46].

Анализ элюата ДНК. Степень деградации ДНК важно определять в судебно-медицинской практике, поскольку негативные условия окружающей среды на месте преступления могут привести к ухудшению качества нуклеиновой кислоты. Следует отметить, что молекулы ДНК более стабильны и менее подвержены разрушениям, чем РНК. По этой причине проведение анализа степени чистоты и целостности ДНК проводят значительно реже. При этом и для элюатов ДНК сохраняется общее правило – регулярно использовать разведения нуклеиновых кислот, чтобы продемонстрировать, что наблюдаемое снижение значения цикла количественной оценки или числа копий согласуется с ожидаемым результатом [47].

Требования к реакции обратной транскрипции. При работе с элюатами РНК для последующего проведения количественной ПЦР-РВ требуется осуществлять реакцию обратной транскрипции, которая может вносить существенные изменения в проводимый анализ [48, 49]. Исходя из этого, в протоколе анализа необходимо подробно отражать следующую информацию:

- компонентный состав реактивов;
- температурно-временной режим реакции обратной транскрипции;
- количество РНК в собранном элюате;
- разработка дизайна праймеров;
- тип фермента;
- объем реакции.

Рекомендуется этап обратной транскрипции выполнять сразу для 2–3 экземпляров исследуемого элюата,

при этом общая концентрация РНК в них должна быть одинаковой [49].

Требования к количественной реакции амплификации в режиме реального времени. Для разработки методики на основе количественной ПЦР-РВ автор должен владеть следующим набором информации:

- идентификационные номера исследуемых участков генов или полных геномов в базе данных (например, GenBank, WIPO Sequence или др.);
- расположение экзонов в РНК для каждого олигонуклеотидного праймера и зонда;
- последовательности нуклеотидов и концентрации каждого олигонуклеотида, положения применяемых в зонде красителей и/или модифицированных структур;
- публикация последовательностей праймеров и зондов (поскольку эффективность реакции амплификации во многом зависит от используемых олигонуклеотидов);
- название, свойства и концентрация полимеразы;
- количество матрицы (ДНК или кДНК) в каждой реакции;
- концентрация катионов Mg^{2+} ;
- точный химический состав буферного раствора (минеральные соли, дополнительные присадки, концентрация ионов водорода);
- общий объем компонентов для одной реакции;
- свидетельство о проверке прибора для проведения ПЦР;
- данные по временным и температурным режимам термоциклирования;
- сведения о степени прозрачности пластиковой посуды для проведения ПЦР и материалу, из которого она изготавливается (поскольку разные пластмассы демонстрируют существенные различия в отражении флуоресценции и чувствительности) [50, 51].

Требования к расчету олигонуклеотидных праймеров и зондов. Структура нуклеиновой кислоты – мишени (например, стволовой и петлевой вторичной РНК) оказывает существенное влияние на эффективность реакции обратной транскрипции и ПЦР [52]. Следовательно, положения праймеров, зондов и ПЦР-ампликонов должны учитывать сворачивание матриц РНК.

Для разработки методик на основе количественной ПЦР-РВ полезно применять такие инструменты для определения специфичности олигонуклеотидов *in silico*, как BLAST² и др. Любая заметная гомология с псевдогенами или другими мишенями должна быть задокументирована и представлена в виде выровненных последовательностей.

Важным требованием является подтверждение специфичности прямыми экспериментальными данными (например, результатами электрофореза, профилем плавления, секвенированием цепочек ДНК, размером ампликона или расщеплением с помощью рестриктаз) [53, 54].

Важной характеристикой праймеров является их размер, от которого зависит специфичность реакции. Как правило, длина праймеров находится в диапазоне от 17 до 35 н. о., но могут быть исключения (допустима большая длина). Длина нуклеотидной цепи влияет на температуру плавления. Температура плавления

² Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Режим доступа: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

(гибридизации, диссоциации, T_m – temperature melting) – температура, при которой $1/2$ молекул олигонуклеотидов находится в гибридном состоянии с матрицей, а половина – в одонитевом свободном состоянии. T_m определяется прочностью водородных связей между нуклеотидами праймера и той молекулы ДНК, с которой он гибридизуется. Существуют различные подходы к определению данного показателя. Преимущественно температуру плавления определяют как точку перегиба на графике гибридизации, что соответствует максимальной точке на графике первой производной. Реже за температуру диссоциации праймеров принимают именно такую, при которой достигнута половина от максимального уровня флуоресцентного сигнала [17, 54–56]. Нужно заметить, что существуют расчетное и истинное значение температуры плавления. Первое получают с применением ряда формул, и это значение является теоретическим, второе – в процессе проведения молекулярно-биологического исследования опытным путем. На практике для решения этой задачи пользуются различными формулами или ресурсами биоинформатики [57, 58].

Термодинамические расчеты с учетом базовой энергии выполняют, как описано K. J. Breslauer et al. [59], но с использованием значений, опубликованных N. Sugimoto et al. [60]. Термодинамические свойства РНК взяты из работы T. Xia et al. [61]. Расчеты температуры плавления основаны на термодинамической зависимости между энтропией, энтальпией, свободной энергией и температурой: $\Delta H = \Delta G + T\Delta S$, где ΔH – энтальпия; ΔG – энергия Гиббса; T – абсолютная температура (K); ΔS – энтропия.

Изменение энтропии (порядок или мера случайности олигонуклеотида) и энтальпии (тепло, выделяемое или поглощаемое олигонуклеотидом) вычисляются непосредственно путем суммирования значений для пар нуклеотидов, полученных N. Sugimoto et al. [60]. Связь между свободной энергией и концентрацией реагентов и продуктов в состоянии равновесия определяется выражением:

$$\Delta G = RT \ln \left(\frac{[\text{DNA} \times \text{primer}]}{[\text{DNA}] [\text{primer}]} \right),$$

где R – универсальная газовая постоянная (8,31 [Дж/моль × K]); T – абсолютная температура (K); \ln – натуральный логарифм; $[\text{DNA} \times \text{primer}]$ – концентрация связанного комплекса ДНК × праймер; $[\text{DNA}]$ – концентрация несвязанной целевой последовательности ДНК; $[\text{primer}]$ – концентрация несвязанного праймера.

Подставив ΔG , получаем:

$$\Delta H = T\Delta S + RT \ln \left(\frac{[\text{DNA} \times \text{primer}]}{[\text{DNA}] [\text{primer}]} \right).$$

Абсолютную температуру выражают с помощью следующего уравнения:

$$T = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln \left(\frac{[\text{DNA} \times \text{primer}]}{[\text{DNA}] [\text{primer}]} \right)}.$$

Предполагая, что концентрации ДНК и комплекса ДНК × праймер равны (концентрация праймера превышает целевую ДНК, а точка плавления находится там, где концентрации связанной и несвязанной ДНК находятся в равновесии), уравнение упрощается. Эмпирически определено, что существует изменение

свободной энергии на 5 ккал (по N. Sugimoto et al. [60]) во время перехода от одноцепочечной К-форме ДНК. Это представляет собой энергию иницирования спирали. Учитывая также поправки на концентрацию соли, получают уравнение:

$$T = \frac{\Delta H - 3,4 \frac{\text{kcal}}{\text{K mole}}}{\Delta S + R \ln \left(\frac{1}{[\text{primer}]} \right)} + 16,6 \log_{10}([\text{Na}^+]),$$

где T – абсолютная температура (K); ΔH – энтальпия; kcal – энергия; mole – количество вещества; ΔS – энтропия; R – универсальная газовая постоянная (8,31 [Дж/моль × K]); \ln – натуральный логарифм; $[\text{primer}]$ – концентрация несвязанного праймера; \log_{10} – десятичный логарифм (lg); $[\text{Na}^+]$ – концентрация катионов натрия.

Константа корректировки концентрации соли не требуется, поскольку параметры определяются при 1 M NaCl, а lg 1 равен нулю. Исходя из термодинамических расчетов, отжиг происходит при значении водородного показателя, равного 7,0. Расчеты T_m основываются на том, что последовательности не являются симметричными. Для получения оптимальной T олигонуклеотидная последовательность должна иметь длину не менее 8 оснований. Точность расчета снижается после 20–25 нуклеотидов, поскольку уравнения и параметры определены с олигонуклеотидами в диапазоне размеров 14–25 нуклеотидов. Концентрация одновалентных катионов (Na^+ или K^+) должна быть от 0,01 до 1,00 M. Расчет температуры плавления олигонуклеотидов также можно проводить с применением программ биоинформатики, в частности ресурса Primer3Plus³ [50].

Если теоретически определенная температура плавления будет существенно отличаться от истинной, это не критично, поскольку для тест-системы более важна температура отжига (T_a – temperature annealing) и соотношение T_m олигонуклеотидов между собой и их соответствие данной температуре в программе термоциклера. Исходя из этого, исследователи тестируют несколько условий проведения реакции амплификации, а именно температуры отжига праймеров, подбирая оптимальную [15, 48, 50].

Для теоретического определения температуры гибридизации применяют множество различных алгоритмов, но ни один из них не дает 100%-й уверенности в получении истинного значения. Рекомендуемая температура плавления олигонуклеотидов находится в диапазоне 55–75 °C. Температуры гибридизации прямого и обратного праймеров должны отличаться не более чем на 5 °C. Следует отметить, что чем больше G+C-содержание и длина олигонуклеотида, тем выше T_m [22].

Транскрипты большинства генов многоклеточных организмов альтернативно сплайсируются, и эти варианты сплайсинга определяют альтернативные изоформы белка. Известно, что существуют различия в паттернах сплайсинга в разных тканях или на разных стадиях развития. Следовательно, для одного экзона может быть обнаружено несколько вариантов сплайсинга, в то время как олигонуклеотидные праймеры, охватывающие интрон, могут быть более избирательными и вообще пропускать некоторые варианты сплайсинга [45].

³ Primer3Plus. Режим доступа: <https://www.primer3plus.com>.

Исходя из этих сведений, при разработке методик на основе количественной ПЦР-РВ требуется придерживаться следующих правил (и исключений) при определении генов-мишеней для мРНК:

1) использование количественной ПЦР-РВ, нацеленной на 1–2 экзона мРНК, больше недостаточно для описания уровня экспрессии конкретного гена;

2) информация о последовательности олигонуклеотидов должна предоставляться вместе с оценкой их специфичности по отношению к известным вариантам сплайсинга и позициям однонуклеотидного полиморфизма [54]. Для наборов праймеров, выбранных из базы данных RTprimerDB [56], это легко сделать, обратившись к веб-сервису⁴, где содержится вся соответствующая информация. Не рекомендуется предоставлять результаты, которые были подтверждены только *in silico*;

3) следует помнить, что обнаружение присутствия мРНК не дает никакой информации о том, будет ли эта мРНК транслироваться в белок и будет ли вообще транслироваться в функциональный белок [36].

Требования к контролям и калибраторам количественной ПЦР-РВ. Кроме контроля на этапах выделения нуклеиновой кислоты и реакции обратной транскрипции для разработки методик количественного анализа требуются еще и дополнительные средства контроля и/или калибраторы количественного определения [27, 36].

Внутренний отрицательный контроль. Рекомендуется применять внутренний контрольный образец (ВКО, NTS – no template control), который позволяет обнаруживать загрязнение реакционной смеси, а также образование неспецифических продуктов реакции амплификации, в частности димеров праймеров [48].

Использование ВКО основано на возможности проведения в одной реакционной смеси нескольких практически независимых реакций амплификации для ДНК-фрагментов разной длины (мультиплексная ПЦР) [62, 63]. Так, например, для контроля эффективности реакции амплификации можно использовать одновременное протекание двух ПЦР в одной пробирке. В одной из таких реакций происходит накопление целевого фрагмента ДНК (или кДНК), а в другой амплифицируется специально добавленная в реакцию ДНК (обычно это фрагмент плазмидной ДНК). С помощью ВКО, добавляемого в образец перед этапом выделения нуклеиновой кислоты, можно проконтролировать эффективность всех этапов анализа.

В случае ПЦР с обратной транскрипцией рекомендуется использовать ВКО – это специально сконструированный препарат РНК, добавляемый к каждому анализируемому образцу на этапе пробоподготовки биоматериала (экзогенный внутренний контроль), который проходит все этапы полимеразной цепной реакции. На этапе детекции ПЦР для ВКО позволяет судить о качестве результата при проведении реакции амплификации в целом. Его добавляют непосредственно перед выделением нуклеиновой кислоты. Если при ПЦР-анализе получают сигнал от ВКО, это свидетельствует о том, что результат реакции можно учитывать, в обратном случае результат ПЦР будет недействительным [2, 52].

Внутренний контрольный образец должен быть включен для каждой серии исследований образцов

с установлением условий для оценки результата реакции. Например, загрязнение можно игнорировать при значении цикла количественной оценки, равном 40 для ВКО, если C_q для самой низкой концентрации равен 35 [9].

Для получения оптимальных результатов ПЦР рекомендуется использовать отдельные рабочие зоны для приготовления реакционной смеси, добавления матрицы и проведения реакции [17].

Положительный контроль на этапе ПЦР в виде нуклеиновых кислот, выделенных из экспериментальных образцов, необходим для мониторинга изменения результатов анализа с течением времени и когда калибровочные кривые не получают при каждой постановке реакции.

Калибраторами количественного определения могут быть следующие материалы:

- очищенные молекулы-мишени (синтетические олигонуклеотиды РНК или ДНК, охватывающие полный ПЦР-ампликон);
- конструкции плазмидной ДНК;
- кДНК, клонированная в плазмиды;
- РНК, транскрибируемая *in vitro*;
- эталонные пулы РНК;
- РНК или ДНК из биологических образцов или общепризнанные биологические стандарты.

Разведения суспензий положительных контролей следует проводить до определенных предельных концентраций. Последовательные разведения заданной матрицы могут быть приготовлены в виде исходных растворов, которые выдерживают несколько циклов замораживания-оттаивания. Свежую порцию следует готовить при обнаружении сдвига цикла количественной оценки на 0,5–1,0. В качестве альтернативы растворы для калибровочных кривых можно хранить не более одной недели при температуре $(2 \pm 1) ^\circ\text{C}$ [12].

Для диагностических анализов на основе количественной ПЦР-РВ необходимо применять независимый проверенный калибратор, если таковой имеется, который находится в пределах линейного интервала анализа.

Отрицательный контроль на этапе ПЦР. Кроме положительного контроля на этапе реакции амплификации непременно требуется использовать отрицательный контроль, в качестве которого наиболее часто применяют деионизированную воду, неконтаминированную посторонними нуклеиновыми кислотами, ферментами, микроорганизмами [35].

Контроли на этапе выделения нуклеиновой кислоты. Рекомендуется использовать положительный и отрицательный контроли экстракции нуклеиновой кислоты, которые применяют на этапе выделения РНК/ДНК [55].

Эффективность проводимого анализа. При разработке методики на основе количественной ПЦР-РВ необходимо определять следующие рабочие характеристики анализа: эффективность реакции амплификации, линейный динамический диапазон, предел обнаружений и точность.

Эффективность реакции амплификации. Надежность и точность результатов количественной ПЦР-РВ напрямую зависят от степени эффективности реакции амплификации, которая особенно важна при представлении данных о концентрациях мРНК для генов-мишеней по сравнению с концентрациями референсных генов.

⁴ RTprimerDB. Режим доступа: <http://www.rtpimerdb.org>.

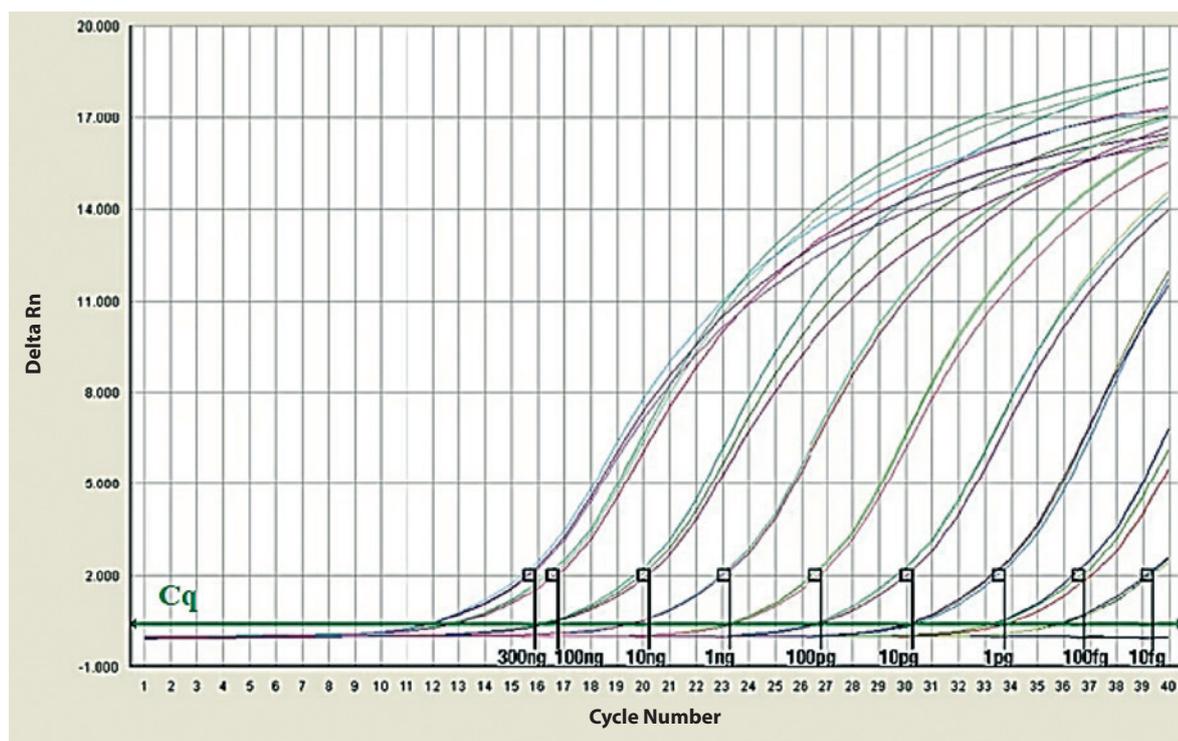


Рис. Кривые накопления флуоресцентного сигнала при анализе суспензий кДНК вируса ящура с концентрациями аналита от 10 фг до 300 нг/мл

Fig. Fluorescence accumulation curves obtained by testing of FMDV cDNA suspensions at analyte concentrations within 10 fg to 300 ng/mL

Детекция значений C_q (ΔC_q) является одним из наиболее известных способов определения различий в концентрациях аналита между образцами, который основан на нормализации с помощью одного эталонного гена. Вычисляется разница в значениях циклов количественной оценки (ΔC_q) между геном-мишенью и геном-эталоном, и C_q различных образцов сравниваются непосредственно. Два гена должны быть амплифицированы с сопоставимой эффективностью, чтобы это сравнение было точным [21, 43]. На рисунке в качестве примера отражены кривые накопления флуоресцентного сигнала для суспензий кДНК вируса ящура с разными концентрациями аналита (от 10 фг до 300 нг/мл).

Эффективность реакции амплификации должна быть установлена с помощью графиков, поскольку такая калибровка обеспечивает простое, быстрое и воспроизводимое определение среднего значения эффективности ПЦР, аналитической чувствительности и надежности анализа. Эффективность реакции амплификации определяют по угловому коэффициенту логарифмически линейной части калибровочной кривой, пользуясь формулой: $E = 10^{-1/k} - 1$, где k – угловой коэффициент (slope) графика зависимости двух величин: логарифма начальной концентрации матрицы (независимая переменная), нанесенного на график по оси абсцисс, и значения C_q (зависимая переменная), расположенного на оси ординат.

Значение E , равное 1,00 (или 100%), указывает на то, что количество продукта удваивается с каждым циклом (теоретически).

Полученные результаты исследования, а также значение углового коэффициента требуется внести в протоколы количественной ПЦР-РВ. Различия в эффективности реакции амплификации приводят

к получению калибровочных кривых с разным углом наклона. Как следствие, различия между значениями циклов количественной оценки целевых и референтных данных не будут оставаться постоянными, поскольку количества в контрольных образцах варьируют, и расчеты относительных концентраций будут неточными и приводящими к искаженным результатам [12, 35, 54].

Следует обратить внимание на то, что при значениях циклов количественной оценки, приближенных к 40, высока вероятность низкой эффективности либо содержание аналита имеет значения ниже аналитической чувствительности [36].

Динамический диапазон определений аналита с помощью количественной ПЦР-РВ. При разработке методики необходимо описать динамический диапазон количественного анализа – промежуток значений содержания аналита в исследуемых образцах, в котором реакция амплификации является линейной [39]. Динамический диапазон должен охватывать не менее трех порядков величины. Линейный интервал калибровочной кривой должен указывать интервал для количественного определения целевых нуклеиновых кислот [14].

Учитывая, что нижние пределы количественного определения обычно плохо выявляют, следует определять изменения количественных показателей при самой низкой концентрации. Должны быть указаны коэффициенты корреляции (значения r^2), и по всему линейному динамическому диапазону должны предоставляться 95%-е доверительные интервалы [64].

Предел обнаружения (LOD – limit of detection) – это минимальное содержание аналита в пробе, которое может быть выявлено с приемлемым уровнем

достоверности. Следовательно, LOD определяется как самая низкая концентрация, при которой обнаруживается 95% положительных проб. Таким образом, в группе повторов исследования проб, содержащих аналит в концентрациях, равных LOD, должно наблюдаться не более 5% реакций с отсутствием результата. Количественные ПЦР-РВ с низким содержанием копий стохастически ограничены, и предел обнаружения, равный трем копиям, в ПЦР невозможен. Однако, если проводится несколько реакций, точное количественное определение более низких концентраций может быть получено с помощью цифровой ПЦР [18, 22].

Наименьшее количество аналита находят по формуле: $LOD = 3,3 \times S_b/k$, где S_b – стандартное отклонение детектируемого сигнала, которое соответствует стандартному отклонению свободного члена (b); k – тангенс угла наклона [65, 66]. Свободный член находят при анализе определенного количества модельных образцов с известными значениями концентрации аналита.

Предел количественного определения (ПКО). Минимальное значение концентрации аналита, определенное с соответствующей правильностью и прецизионностью валидируемой методики, рассчитывают с применением формулы: $ПКО = 10 \times S_b/k$ [66]. Полученное значение ПКО подтверждают прямым экспериментом при исследовании определенного количества модельных образцов с концентрациями аналита, близкими к найденному значению ПКО. Анализ проводят как минимум в пяти повторениях. Результаты исследования считают достоверными при $p < 0,05$ [66–69].

Линейность. Существование линейной зависимости двух показателей в пределах диапазона применения методики проверяют в ходе эксперимента, детектируя показатель для количества проб, равного ≥ 30 , с различными концентрациями аналита с не менее тремя повторениями. Полученные данные обрабатывают методом наименьших квадратов с использованием регрессионной модели $y = k \times x + b$, где k – угловой коэффициент; b – свободный член. Достоверность результатов анализа подтверждают, вычисляя коэффициент корреляции (r^2), который по модулю должен быть $\geq 0,99$ [69].

Правильность. Для определения правильности проводят анализ проб с известными значениями аналита, осуществляя постановку количественного варианта ПЦР. Данные предоставляют в виде уравнения линейной зависимости между экспериментально найденными с помощью количественной ПЦР (y) и эталонными (x) значениями аналита: $y = k \times x + b$. Для полученной функции проверяют гипотезы о равенстве тангенса угла наклона (k) единице и равенстве свободного члена (b) нулю. При доказательстве верности указанных гипотез со степенью надежности, равной 0,05, использование валидируемой методики дает свободные от ошибки результаты [64].

Прецизионность. Для оценки прецизионности разрабатываемых тест-систем на основе количественной ПЦР-РВ в условиях сходимости и воспроизводимости требуется рассчитывать абсолютные и относительные показатели вариации.

Определение абсолютных показателей вариации. Размах вариации (R) определяют как разность между максимальным и минимальным значениями цикла количественной оценки: $R = Cq_{\max} - Cq_{\min}$. Индивидуальное линейное отклонение (d_i) находят с помощью

формулы $d_i = |Cq_i - Cq_{cp}|$. Среднее линейное отклонение (d_{cp}) рассчитывают как среднее арифметическое из индивидуальных линейных отклонений: $d_{cp} = \sum |d_i| / N$, где d_i – индивидуальные линейные отклонения циклов количественной оценки; N – объем совокупности. Оценку дисперсии (δ^2) показателей осуществляют с применением формулы: $\delta^2 = (\sum d_i^2) / N$. Для характеристики размеров вариации Cq рассчитывают среднее квадратичное отклонение (δ), пользуясь математической моделью $\delta = \sqrt{\delta^2}$ [64–66, 70].

Определение относительных показателей вариации. Коэффициент осцилляции (V_R) вычисляют по формуле: $V_R = R / C_{tcp} \times 100$. Линейный коэффициент вариации (C_v) рассчитывают с применением математической модели $C_v = d_{cp} / C_{tcp} \times 100$. Для оценки колеблемости индивидуальных значений C_p определяют коэффициент вариации (C_δ) по формуле: $C_\delta = \delta / C_{tcp} \times 100$ [17]. Метод считают надежным при $C_\delta < 2\%$ в условиях сходимости и при $C_\delta < 3\%$ в условиях воспроизводимости [64–67].

Определение статистических показателей тест-системы. Основными статистическими показателями тест-систем являются: диагностическая чувствительность (DSe), диагностическая специфичность (DSp), k-критерий (индекс каппа Коэна), прогностичность положительного результата (PPV), прогностичность отрицательного результата (NPV). Для их установления требуются следующие данные по результатам исследования: a – истинно положительные образцы; b – ложноотрицательные образцы; c – ложноположительные образцы; d – истинно отрицательные образцы.

Диагностические чувствительность и специфичность определяют по формулам: $DSe = a / (a + b)$ и $DSp = d / (c + d)$ – и выражают в процентах.

Индекс каппа Коэна (k-критерий) используется для измерения степени согласованности между любыми двумя методами. Данный параметр находят по расчетной формуле: $k = (Pr(a) - Pr(e)) / (1 - Pr(e))$, где Pr(a) – относительное наблюдаемое согласие; Pr(e) – гипотетическая вероятность случайного согласия.

Вероятность положительного результата реакции при исследовании истинно положительных проб находят по формуле: $PPV = (DSe \times prevalence) / ((DSe \times prevalence) + (1 - DSp) \times (1 - prevalence))$, где prevalence – показатель превалентности, распространенности (число событий, в данном варианте – случаев выявления положительных проб из истинно положительных в определенный момент). Данный показатель должен стремиться к 100%.

Вероятность отрицательного результата реакции при исследовании истинно отрицательных проб рассчитывают по формуле: $NPV = DSp \times (1 - prevalence) / ((1 - DSe) \times prevalence + DSp \times (1 - prevalence))$. Данный показатель должен стремиться к 100% [64–68, 70].

ТРЕБОВАНИЯ К АНАЛИЗУ ДАННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР-РВ

Общие требования. Анализ данных включает в себя изучение исходных данных, оценку их качества и надежности, а также формирование отчетных результатов [2, 71]. При разработке количественной ПЦР в режиме реального времени в протоколе необходимо указывать актуальную информацию:

- методы анализа данных и оценки достоверности;
- спецификацию программного обеспечения;
- методы выявления выбросов;

– статистические и валидационные методы, используемые для оценки отклонений (например, 95%-й доверительный интервал), и представление соответствующих концентраций или значений C_q для анализа прецизионности в условиях сходимости и воспроизводимости [67, 70].

Нормализация данных количественной ПЦР-РВ.

Нормализация является важным этапом анализа точности количественной ПЦР, поскольку этот процесс контролирует изменения на этапах выделения нуклеиновой кислоты, реакции обратной транскрипции и эффективности амплификации, что позволяет сравнивать концентрации мРНК в разных анализируемых образцах.

Важным инструментом для проведения нормализации данных количественной ПЦР-РВ является использование эталонных генов в качестве внутреннего контроля. Нормализация включает в себя представление данных об отношении концентраций мРНК интересующих генов к концентрациям эталонных генов. мРНК эталонных генов должны быть стабильно экспрессированы, и их содержание должно демонстрировать высокую корреляцию с общим количеством нуклеиновой кислоты данного типа, присутствующей в образцах.

Следует отметить, что нормализация по одному эталонному гену неприемлема, если исследователи не предоставят для рецензентов четких доказательств, подтверждающих его инвариантную экспрессию в описанных экспериментальных условиях [25]. Оптимальное количество и выбор эталонных генов должны быть определены экспериментально. Подробно данный процесс описан в публикациях J. Vandesompele et al. [72], C. L. Andersen et al. [73].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного анализа публикаций и международных протоколов были представлены общие требования и отражены рекомендуемые правила разработки методик на основе количественного ПЦР-анализа в режиме реального времени, соблюдение которых позволит рецензентам полноценно охарактеризовать проведенное исследование, а другим исследователям – воспроизвести его.

В соответствии с современными подходами (в частности, с руководящими принципами MIQE – база контрольных списков разработанных методик количественной ПЦР⁵) при представлении материалов используют язык разметки данных количественной ПЦР в реальном времени (RDML), который является структурированным и универсальным стандартом результатов для обмена количественными данными реакции амплификации. Согласно данным принципам методика должна содержать достаточную информацию для повторного анализа данных и интерпретации результатов. Стандарт данных представляет собой сжатый текстовый файл в формате XML (расширяемый язык разметки), обеспечивающий прозрачный обмен аннотированными данными количественной ПЦР-РВ между программным обеспечением прибора и сторонними пакетами анализа данных, между коллегами и соавторами, а также между авторами, рецензентами, журналами и читателями.

⁵ MIQE: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Режим доступа: <http://rdml.org/miqe>.

В целом в представленной публикации отражена информация для достижения трех конечных целей работы:

1. Дать авторам широкий арсенал инструментов и требований для разработки методик на основе количественной ПЦР-РВ.
2. Позволить рецензентам и редакторам определять технические качества материалов с разработками разных методик на основе ПЦР в соответствии с установленными критериями.
3. Облегчить воспроизведение экспериментов, описанных в опубликованных исследованиях, которые следуют представленным выше требованиям, и получать однородные, сопоставимые и надежные результаты количественной ПЦР-РВ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Bernard P. S., Wittwer C. T. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin. Chem.* 2002; 48 (8): 1178–1185. PMID: 12142370.
2. Burns M. J., Valdivia H., Harris N. Analysis and interpretation of data from real-time PCR trace detection methods using quantitation of GM soya as a model system. *Anal. Bioanal. Chem.* 2004; 378 (6): 1616–1623. DOI: 10.1007/s00216-003-2441-9.
3. Bustin S. A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M. W. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *J. Mol. Endocrinol.* 2005; 34 (3): 597–601. DOI: 10.1677/jme.1.01755.
4. Bustin S. A., Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin. Sci. (Lond.)*. 2005; 109 (4): 365–379. DOI: 10.1042/CS20050086.
5. Bustin S. A., Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J. Biomol. Tech.* 2004; 15 (3): 155–166. PMID: 15331581.
6. Damond F., Benard A., Ruelle J., Alabi A., Kupfer B., Gomes P., et al. Quality control assessment of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) viral load quantification assays: results from an international collaboration on HIV-2 infection in 2006. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46 (6): 2088–2091. DOI: 10.1128/JCM.00126-08.
7. Bustin S. A., Mueller R. Real-time reverse transcription PCR and the detection of occult disease in colorectal cancer. *Mol. Aspects Med.* 2006; 27 (2–3): 192–223. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.002.
8. Ferns R. B., Garson J. A. Development and evaluation of a real-time RT-PCR assay for quantification of cell-free human immunodeficiency virus type 2 using a Brome Mosaic Virus internal control. *J. Virol. Methods.* 2006; 135 (1): 102–108. DOI: 10.1016/j.jviromet.2006.02.005.
9. Garson J. A., Grant P. R., Ayliffe U., Ferns R. B., Tedder R. S. Real-time PCR quantitation of hepatitis B virus DNA using automated sample preparation and murine cytomegalovirus internal control. *J. Virol. Methods.* 2005; 126 (1–2): 207–213. DOI: 10.1016/j.jviromet.2005.03.001.
10. Garson J. A., Huggett J. F., Bustin S. A., Pfaffl M. W., Benes V., Vandesompele J., Shipley G. L. Unreliable real-time PCR analysis of human endogenous retrovirus-W (HERV-W) RNA expression and DNA copy number in multiple sclerosis. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2009; 25 (3): 377–378. DOI: 10.1089/aid.2008.0270.
11. Huang T., Li L. T., Bernstam E. V., Jiang X. Confidence-based laboratory test reduction recommendation algorithm. *BMC Med. Inform. Decis. Mak.* 2023; 23 (1):93. DOI: 10.1186/s12911-023-02187-3.
12. Shaw A., Reid S. M., Ebert K., Hutchings G., Ferris N., King D. Implementation of a one-step real-time RT-PCR protocol for diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Virol. Methods.* 2007; 143 (1): 81–85. DOI: 10.1016/j.jviromet.2007.02.009.
13. Schmidt M. W., Houseman A., Ivanov A. R., Wolf D. A. Comparative proteomic and transcriptomic profiling of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Syst. Biol.* 2007; 3:79. DOI: 10.1038/msb4100117.
14. Wittwer C. T., Herrmann M. G., Moss A. A., Rasmussen R. P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques.* 1997; 22 (1): 130–138. DOI: 10.2144/97221bi01.
15. Wittwer C. T., Kuskawa N. Real-time PCR. In: *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. Ed. by D. H. Persing, F. C. Tenover, J. Versalovic, J. W. Tang, E. R. Unger, D. A. Relman, T. J. White. Washington: ASM Press; 2004; 71–84.
16. Bjornsson H. T., Albert T. J., Ladd-Acosta C. M., Green R. D., Rongione M. A., Middle C. M., et al. SNP-specific array-based allele-specific expression analysis. *Genome Res.* 2008; 18 (5): 771–779. DOI: 10.1101/gr.073254.107.
17. Brazma A., Hingamp P., Quackenbush J., Sherlock G., Spellman P., Stoeckert C., et al. Minimum information about a microarray experiment

- (MIAME) – toward standards for microarray data. *Nat. Genet.* 2001; 29 (4): 365–371. DOI: 10.1038/ng1201-365.
18. Burns M., Valdivia H. Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR. *Eur. Food Res. Technol.* 2008; 226: 1513–1524. DOI: 10.1007/s00217-007-0683-z.
19. Bustin S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 2000; 25 (2): 169–193. DOI: 10.1677/jme.0.0250169.
20. Doma M. K., Parker R. RNA quality control in eukaryotes. *Cell.* 2007; 131 (4): 660–668. DOI: 10.1016/j.cell.2007.10.041.
21. Fleige S., Pfaffl M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol. Aspects Med.* 2006; 27 (2–3): 126–139. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.003.
22. Burns M. J., Nixon G. J., Foy C. A., Harris N. Standardisation of data from real-time quantitative PCR methods – evaluation of outliers and comparison of calibration curves. *BMC Biotechnol.* 2005; 5:31. DOI: 10.1186/1472-6750-5-31.
23. Bustin S. A. Real-time, fluorescence-based quantitative PCR: a snapshot of current procedures and preferences. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2005; 5 (4): 493–498. DOI: 10.1586/14737159.5.4.493.
24. Gingeras T. R. RNA reference materials for gene expression studies. Difficult first steps. *Clin. Chem.* 2004; 50 (8): 1289–1290. DOI: 10.1373/clinchem.2003.030072.
25. Hellems J., Mortier G., De Paepe A., Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 2007; 8 (2):R19. DOI: 10.1186/gb-2007-8-2-r19.
26. Karlen Y., McNair A., Perseguers S., Mazza C., Mermod N. Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics.* 2007; 8:131. DOI: 10.1186/1471-2105-8-131.
27. Lefever S., Hellems J., Pattyn F., Przybylski D. R., Taylor C., Geurts R., et al. RDML: structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37 (7): 2065–2069. DOI: 10.1093/nar/gkp056.
28. Ellison S. L., English C. A., Burns M. J., Keer J. T. Routes to improving the reliability of low level DNA analysis using real-time PCR. *BMC Biotechnol.* 2006; 6:33. DOI: 10.1186/1472-6750-6-33.
29. Huggett J., Dheda K., Bustin S., Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 2005; 6 (4): 279–284. DOI: 10.1038/sj.gene.6364190.
30. Micke P., Ohshima M., Tahmasebpoor S., Ren Z. P., Ostman A., Pontén F., Botling J. Biobanking of fresh frozen tissue: RNA is stable in nonfixed surgical specimens. *Lab. Invest.* 2006; 86 (2): 202–211. DOI: 10.1038/labinvest.3700372.
31. Kubista M., Andrade J. M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* 2006; 27 (2–3): 95–125. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.007.
32. Böhlenius H., Eriksson S., Parcy F., Nilsson O. Retraction. *Science.* 2007; 316:367. DOI: 10.1126/science.316.5823.367b.
33. Echeverri C. J., Beachy P. A., Baum B., Boutros M., Buchholz F., Chanda S. K., et al. Minimizing the risk of reporting false positives in large-scale RNAi screens. *Nat. Methods.* 2006; 3 (10): 777–779. DOI: 10.1038/nmeth1006-777.
34. Landi D., Gemignani F., Naccarati A., Pardini B., Vodicka P., Vodickova L., et al. Polymorphisms within micro-RNA-binding sites and risk of sporadic colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 2008; 29 (3): 579–584. DOI: 10.1093/carcin/bgm304.
35. Mackay I. M., Arden K. E., Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30 (6): 1292–1305. DOI: 10.1093/nar/30.6.1292.
36. Mackay I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10 (3): 190–212. DOI: 10.1111/j.1198-743x.2004.00722.x.
37. Morrogh M., Olvera N., Bogomolnii F., Borgen P. I., King T. A. Tissue preparation for laser capture microdissection and RNA extraction from fresh frozen breast tissue. *BioTechniques.* 2007; 43 (1): 41–42, 44, 46. DOI: 10.2144/000112497.
38. Nolan T., Hands R. E., Ogunkolade W., Bustin S. A. SPUD: a quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations. *Anal. Biochem.* 2006; 351 (2): 308–310. DOI: 10.1016/j.ab.2006.01.051.
39. Taylor C. F., Field D., Sansone S. A., Aerts J., Apweiler R., Ashburner M., et al. Promoting coherent minimum reporting guidelines for biological and biomedical investigations: the MIBBI project. *Nat. Biotechnol.* 2008; 26 (8): 889–896. DOI: 10.1038/nbt.1411.
40. Joseph L. J. RNA reference materials for gene expression studies. RNA metrology: forecast calls for partial clearing. *Clin. Chem.* 2004; 50 (8): 1290–1292. DOI: 10.1373/clinchem.2004.032441.
41. Cronin M., Ghosh K., Sistare F., Quackenbush J., Vilker V., O'Connell C. Universal RNA reference materials for gene expression. *Clin. Chem.* 2004; 50 (8): 1464–1471. DOI: 10.1373/clinchem.2004.035675.
42. MSI Board Members; Sansone S. A., Fan T., Goodacre R., Griffin J. L., Hardy N. W., et al. The metabolomics standards initiative. *Nat. Biotechnol.* 2007; 25 (8): 846–848. DOI: 10.1038/nbt0807-846b.
43. Gygi S. P., Rochon Y., Franza B. R., Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 1999; 19 (3): 1720–1730. DOI: 10.1128/MCB.19.3.1720.
44. Reiter M., Pfaffl M. W. Effects of plate position, plate type and sealing systems on real-time PCR results. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* 2008; 22 (3): 824–828. DOI: 10.1080/13102818.2008.10817561.
45. Ben-Dov C., Hartmann B., Lundgren J., Valcárcel J. Genome-wide analysis of alternative pre-mRNA splicing. *J. Biol. Chem.* 2008; 283 (3): 1229–1233. DOI: 10.1074/jbc.R700033200.
46. Higuchi R., Dollinger G., Walsh P. S., Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Nat. Biotechnol.* 1992; 10 (4): 413–417. DOI: 10.1038/nbt0492-413.
47. Huggett J. F., Novak T., Garson J. A., Green C., Morris-Jones S. D., Miller R. F., Zumla A. Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon. *BMC Res. Notes.* 2008; 1:70. DOI: 10.1186/1756-0500-1-70.
48. Schmittgen T. D., Livak K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 2008; 3 (6): 1101–1108. DOI: 10.1038/nprot.2008.73.
49. Ståhlberg A., Håkansson J., Xian X., Semb H., Kubista M. Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clin. Chem.* 2004; 50 (3): 509–515. DOI: 10.1373/clinchem.2003.026161.
50. Taylor C. F., Paton N. W., Lilley K. S., Binz P. A., Julian R. K. Jr., Jones A. R., et al. The minimum information about a proteomics experiment (MIAPE). *Nat. Biotechnol.* 2007; 25 (8): 887–893. DOI: 10.1038/nbt1329.
51. Vogelstein B., Kinzler K. W. Digital PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96 (16): 9236–9241. DOI: 10.1073/pnas.96.16.9236.
52. Dube S., Qin J., Ramakrishnan R. Mathematical analysis of copy number variation in a DNA sample using digital PCR on a nanofluidic device. *PLoS One.* 2008; 3 (8):e2876. DOI: 10.1371/journal.pone.0002876.
53. Field D., Garrity G., Gray T., Morrison N., Selengut J., Sterk P., et al. The minimum information about a genome specification (MIGS) specification. *Nat. Biotechnol.* 2008; 26 (5): 541–547. DOI: 10.1038/nbt1360.
54. Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nat. Biotechnol.* 1993; 11 (9): 1026–1030. DOI: 10.1038/nbt0993-1026.
55. Nolan T., Hands R. E., Bustin S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.* 2006; 1 (3): 1559–1582. DOI: 10.1038/nprot.2006.236.
56. Pattyn F., Speleman F., De Paepe A., Vandesompele J. RTPrimerDB: the real-time PCR primer and probe database. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31 (1): 122–123. DOI: 10.1093/nar/gkg011.
57. Pfaffl M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29 (9):e45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45.
58. Ramsden S. C., Daly S., Geilenkeuser W. J., Duncan G., Hermitte F., Marubini E., et al. EQUAL-quant: an international external quality assessment scheme for real-time PCR. *Clin. Chem.* 2006; 52 (8): 1584–1591. DOI: 10.1373/clinchem.2005.066019.
59. Breslauer K. J., Frank R., Blöcker H., Marky L. A. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986; 83 (11): 3746–3750. DOI: 10.1073/pnas.83.11.3746.
60. Sugimoto N., Nakano S., Katoh M., Matsumura A., Nakamura H., Ohmichi T., et al. Thermodynamic parameters to predict stability of RNA/DNA hybrid duplexes. *Biochemistry.* 1995; 34 (35): 11211–11216. DOI: 10.1021/bi00035a029.
61. Xia T., SantaLucia J. Jr., Burkard M. E., Kierzek R., Schroeder S. J., Jiao X., et al. Thermodynamic parameters for an expanded nearest-neighbor model for formation of RNA duplexes with Watson-Crick base pairs. *Biochemistry.* 1998; 37 (42): 14719–14735. DOI: 10.1021/bi9809425.
62. Elnifro E. M., Ashshi A. M., Cooper R. J., Klapper P. E. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 13 (4): 559–570. DOI: 10.1128/CMR.13.4.559.
63. Wittwer C. T., Herrmann M. G., Gundry C. N., Elenitoba-Johnson K. S. Real-time multiplex PCR assays. *Methods.* 2001; 25 (4): 430–442. DOI: 10.1006/meth.2001.1265.
64. Государственная фармакопея Российской Федерации. Ч. 1. 12-е изд. М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения; 2008. 696 с.
Russia State Pharmacopoeia. Part 1. 12th ed. Moscow: Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products; 2008. 696 p. (in Russ.)
65. Лакин Г. Ф. Биометрия. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Высшая школа; 1990. 351 с.
Lakin G. F. Biometrics. 4th ed., revised and supplemented. Moscow: Vysshaya shkola; 1990. 351 p. (in Russ.)
66. Носырев П., Носырева М., Рассказова Т., Корнеева Н. Валидация аналитических методик: теория и практика (часть I). *Ремедиум.* 2003; 10: 69–71. EDN: PLLZDJ.

Nosyrev P., Nosyрева M., Rasskazova T., Korneeva N. Validatsiya analiticheskikh metodik: teoriya i praktika (chast' I) = Validation of analytical methods: theory and practice (Part I). *Remedium*. 2003; 10: 69–71. EDN: PLLZDJ. (in Russ.)

67. Swango K. L., Hudlow W. R., Timken M. D., Buoncristiani M. R. Developmental validation of a multiplex qPCR assay for assessing the quantity and quality of nuclear DNA in forensic samples. *Forensic Sci. Int.* 2007; 170 (1): 35–45. DOI: 10.1016/j.forsciint.2006.09.002.

68. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. In: *WOAH. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Paris; 2018; Chapter 1.1.6. Режим доступа: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.06_VALIDATION.pdf (дата обращения: 20.01.2013).

69. OIE. Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases. 2nd ed. Paris; 2008. 70 p.

70. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 1–6. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200029975>.

GOST R ISO 5725-1-2002 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 1–6. Available at: <https://docs.cntd.ru/document/1200029975>. (in Russ.)

71. Haney S. A. Increasing the robustness and validity of RNAi screens. *Pharmacogenomics*. 2007; 8 (8): 1037–1049. DOI: 10.2217/14622416.8.8.1037.

72. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paep A., Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; 3 (7): research0034.1–0034.11. DOI: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.

73. Andersen C. L., Jensen J. L., Ørntoft T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004; 64 (15): 5245–5250. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.

Поступила в редакцию / Received 15.03.2023

Поступила после рецензирования / Revised 06.04.2023

Принята к публикации / Accepted 22.05.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Доронин Максим Игоревич, доктор биологических наук, заведующий сектором лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-4682-6559>, e-mail: doronin@arriah.ru.

Михалишин Дмитрий Валерьевич, доктор ветеринарных наук, заведующий лабораторией профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-1718-1955>, e-mail: mihalishindv@arriah.ru.

Спрыгин Александр Владимирович, доктор биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-5982-3675>, e-mail: sprygin@arriah.ru.

Мазлум Али, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-5982-8393>, e-mail: mazlum@arriah.ru.

Жбанова Татьяна Валентиновна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник отдела образования и научной информации, ученый секретарь диссертационного совета ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-9857-5915>, e-mail: zhanova@arriah.ru.

Груздев Константин Николаевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-3159-1969>, e-mail: gruzdev@arriah.ru.

Чернышова Елена Владимировна, кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник референтной лаборатории по бешенству и BSE ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-4054-8532>, e-mail: chernishova@arriah.ru.

Maksim I. Doronin, Doctor of Science (Biology), Head of Sector, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-4682-6559>, e-mail: doronin@arriah.ru.

Dmitry V. Mikhailishin, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Head of Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-1718-1955>, e-mail: mihalishindv@arriah.ru.

Alexander V. Sprygin, Doctor of Science (Biology), Senior Researcher, Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-5982-3675>, e-mail: sprygin@arriah.ru.

Ali Mazloun, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Reference Laboratory for African Swine Fever, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-5982-8393>, e-mail: mazlum@arriah.ru.

Tatyana V. Zhanova, Candidate of Science (Biology), Junior Researcher, Education and Scientific Support Department, Academic Secretary of Thesis Council, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-9857-5915>, e-mail: zhanova@arriah.ru.

Konstantin N. Gruzdev, Doctor of Science (Biology), Professor, Chief Researcher, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-3159-1969>, e-mail: gruzdev@arriah.ru.

Elena V. Chernyshova, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Junior Researcher, Reference Laboratory for Rabies and BSE, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-4054-8532>, e-mail: chernishova@arriah.ru.



Влияние врожденного и приобретенного иммунитета на патогенез инфекционной бурсальной болезни

А. Н. Семина

Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства – филиал ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» РАН (ВНИВИП), г. Санкт-Петербург, Россия

РЕЗЮМЕ

Инфекционная бурсальная болезнь вызывается небольшим безоболочечным вирусом, обладающим высокой устойчивостью во внешней среде. Вирус инфекционной бурсальной болезни воздействует на иммунную систему кур всесторонне и комплексно, разрушая В-лимфоциты, привлекая Т-клетки и активируя макрофаги. Как РНК-содержащий вирус, возбудитель характеризуется высокой частотой мутаций, что приводит к появлению штаммов с измененной антигенностью или повышенной вирулентностью. Молекулярная основа патогенности вируса и точная причина клинического заболевания и смерти до сих пор плохо изучены, так как это не имеет четкой связи с тяжестью поражений и степенью повреждения фабрициевой сумки. Однако последние исследования указали на роль усиления врожденного иммунного ответа на ранней стадии инфекции с повышенной продукцией промедиаторов, которые вызывают цитокиновый шторм. В случае инфекционной бурсальной болезни иммунодепрессия является как прямым следствием инфицирования специфических иммунных клеток-мишеней, так и косвенным следствием взаимодействий, происходящих в иммунной сети организма птицы. Инфицирование высоковирулентным штаммом и заражение цыплят в раннем возрасте после переболевания или субклинической инфекции приводит к иммуносупрессии с более серьезными последствиями. Хотя иммунодепрессия, вызванная возбудителем инфекционной бурсальной болезни, в основном направлена на В-лимфоциты, также было продемонстрировано влияние на клеточно-опосредованный иммунитет, что усиливает воздействие вируса на иммунокомпетентность цыплят. Недавний прогресс в области иммунологии птиц позволил лучше узнать иммунологические механизмы, участвующие в развитии заболевания. В данном обзоре основное внимание уделяется роли врожденного иммунитета в патогенезе инфекционной бурсальной болезни, так как он служит первой линией защиты на пути репликации вируса и может определить исход заболевания.

Ключевые слова: обзор, вирус инфекционной бурсальной болезни, инфекция, врожденный иммунитет, цыплята

Для цитирования: Семина А. Н. Влияние врожденного и приобретенного иммунитета на патогенез инфекционной бурсальной болезни. *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (3): 208–214. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-208-214.

Конфликт интересов: Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Семина Анна Николаевна, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник, заведующий отделом диагностики и эпизоотологического анализа ВНИВИП, 198412, Россия, г. Санкт-Петербург, г. Ломоносов, ул. Черникова, 48, e-mail: anna14.05@mail.ru.

Effect of innate and induced immunity on infectious bursal disease pathogenesis

A. N. Semina

All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry Science – Branch of the FSBSI FSC “All-Russian Research and Technological Poultry Institute” of RAS (ARRVIPS), Saint Petersburg, Russia

SUMMARY

Infectious bursal disease (IBD) is induced by a small non-enveloped virus, which is highly stable in the outer environment. The infectious bursal disease virus (IBDV) affects chicken's immune system in a comprehensive and integrated manner thus destructing B-lymphocytes, attracting T-cells and activating macrophages. Being the RNA-virus, the agent is specified by high frequency of mutations, which result in the emergence of the strains with modified antigenicity and increased virulence. The molecular basis for the virus pathogenicity and exact cause of the clinical disease and death are still understudied as they are not clearly associated with the disease severity and degree of bursa of Fabricius lesions. Recent studies, however, demonstrated the role of the enhanced immune response at early stage of the infection along with increased production of cytokine storm-inducing promediators. In case of IBD, the immunosuppression is both direct consequence of specific target-cell infection and indirect consequence of the interactions occurring in the bird's immune network. Infection with highly virulent virus strain or chicks' infection at early age after recovery or subclinical infection results in immunosuppression with more severe consequences. Since immunosuppression induced by IBD agent is targeted mostly at B-lymphocytes, effect on the cell-mediated immunity was also demonstrated and it enhances the virus pressure on the immunocompetence of the chicks. The recent progress in avian immunology allowed for better understanding of the immunological mechanisms involved in the disease development. This review focuses on the role of the innate immunity in IBD pathogenesis as it is the first line of protection against the virus replication and can predetermine the disease outcome.

Keywords: review, infectious bursal disease virus, infection, innate immunity, chicks

For citation: Semina A. N. Effect of innate and induced immunity on infectious bursal disease pathogenesis. *Veterinary Science Today*. 2023; 12 (3): 208–214. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-208-214.

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

For correspondence: Anna N. Semina, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Head of Department of Diagnostics and Epizootological Analysis, ARRIVPS, 198412, 198412, Russia, Saint Petersburg, Lomonosov, ul. Chernikova, 48, e-mail: anna14.05@mail.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционная бурсальная болезнь (Infectious Bursal Disease, IBD), также известная как болезнь Гамборо, представляет собой острое, высококонтагиозное и иммунодепрессивное заболевание птиц, вызываемое вирусом инфекционной бурсальной болезни (*Avibirnavirus gumboroense*¹, Infectious bursal disease virus, IBDV). Впервые он был описан в 1960-х годах в Гамборо, штат Делавер (США). С тех пор IBDV широко распространился по всему миру.

Вирус поражает молодняк, особенно цыплят в возрасте 3–6 недель – на завершающей стадии развития фабрициевой сумки. Он может напрямую атаковать и разрушать фабрициеву сумку – центральный иммунный орган кур, отвечающий за развитие и созревание В-лимфоцитов [1]. Кроме того, возбудитель IBD индуцирует апоптоз В-лимфоцитов не только в бурсе, но также в селезенке и периферической крови, что вызывает иммуносупрессию у выживших цыплят, как следствие, повышает восприимчивость к другим патогенным инфекциям и приводит к неудачам вакцинации. Факторы, влияющие на смертность, вызванную IBDV, многообразны и сложны: фенотипическое разнообразие штаммов, вирулентность вируса, инфицирующая доза, возраст и порода кур, а также уровень пассивного иммунитета [2]. Смертность цыплят, инфицированных вариантами (vIBDV) и высоковирулентными (vvIBDV) штаммами вируса, может достигать 30–100%, что приводит к огромным экономическим потерям для птицеводческой отрасли во всем мире. Хотя вакцинация цыплят живыми аттенуированными или инактивированными вакцинами эффективна для контроля бурсальной болезни в некоторых регионах, ее вспышки все еще часто наблюдаются из-за появления новых вариантных полевых штаммов и реассортантов [3]. Недавно проведенное в Бангладеш сравнительное исследование патогенности для кур трех выбранных изолятов, выделенных во время вспышек IBD в 2020–2021 гг. и принадлежащих к разным генотипам, показало, что наиболее вирулентным оказался изолят BD-25 vvIBDV (A3B2), который вызывал 100%-ю заболеваемость и 90%-ю смертность, в то время как при экспериментальном инфицировании сегмент-реассортантным изолятом BD-28 vIBDV (A3B3) наблюдали 50%-ю заболеваемость и 30%-ю смертность. Однако макроскопические и гистопатологические изменения бурсы в обоих случаях были сходными, что позволяет предположить, что различия в уровне заболеваемости и смертности, вызванные двумя изолятами vvIBDV, могут быть связаны с их генетическим составом.

Как и в более раннем исследовании, классический вирулентный изолят BD-26 (A1aB1) не вызывал клинического заболевания у птиц [4, 5].

Большинство штаммов IBDV, циркулирующих в последнее время в России и Азии, являются вариантными и в основном приводят к субклиническим инфекциям, вызывая огромные экономические потери из-за серьезной иммунодепрессии. Важно отметить, что новые вариантные штаммы IBDV были выделены от цыплят, иммунизированных вакцинами на основе vvIBDV. Это свидетельствует о том, что вариантные штаммы вируса могут преодолевать иммунозащиту, индуцированную препаратами против IBD, созданными с использованием высоковирулентных штаммов. Кроме того, живые аттенуированные вакцины могут вызывать иммуносупрессию у цыплят [6, 7]. Таким образом, полное понимание механизмов, лежащих в основе взаимодействия IBDV с организмом, будет очень полезно при разработке новых иммунологических препаратов.

Вирусы реплицируют и организуют сборку вирусных компонентов в клетках-хозяевах для производства вируса-потомка, который может влиять на синтез этих клеток, метаболизм и другие нормальные физиологические функции, в конечном итоге вызывая заболевания. Для борьбы с патогенами организм постепенно эволюционирует, формируя комплексный и сложный противовирусный иммунный ответ. Врожденный иммунитет является первой линией защиты хозяина от проникновения микроорганизмов. Распознавание вторгшегося патогена является начальным и наиболее важным шагом для вызова врожденного иммунного ответа, он основан на вовлечении патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP) рецепторами распознавания паттернов (PRR) хозяина, такими как Toll-подобные рецепторы (TLR), нуклеотид-связывающие домены олигомеризации NOD-подобные рецепторы (NLR), RIG-I-подобные рецепторы (RLR) и т. д., а также инициации иммунных сигналов для индукции ответа хозяина на вирусную инфекцию [8]. Впоследствии активируется адаптивный иммунный ответ, способствующий элиминации патогенов и формированию иммунологической памяти [9]. Между тем вирусы также выработали несколько механизмов, позволяющих избежать иммунного ответа. В птицеводстве профилактические стратегии с использованием вакцин могут в большинстве случаев предотвращать и контролировать вспышки IBD в неблагополучных по заболеванию районах. Поэтому существует огромный спрос на современные и эффективные препараты против болезни Гамборо. Изучение клеточных факторов и путей, прямо или косвенно влияющих на репликацию вируса, могло бы дать ценные ключи к разработке новых подходов к успешному контролю IBD. Настоящий обзор посвящен

¹ International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV. Режим доступа: https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxonnode_id=202202752.

современному пониманию реакции организма птицы на вызванную IBDV инфекцию как на клеточном уровне, так и на уровне белка.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИРУСА

Вирус инфекционной бурсальной болезни – безоболочечный двухцепочечный РНК-вирус (дцРНК) с однооболочечным икосаэдрическим капсидом, принадлежит к роду *Avibirnavirus* семейства *Birnaviridae*. Его геном состоит из бисегментированной РНК, кодирующей только пять вирусных белков, каждый из которых может выполнять множество функций. Сегмент А имеет длину 3,2 т. п. н. и содержит две частично перекрывающиеся открытые рамки считывания (ORF), кодирующие большой полипротеиновый предшественник (pVP2-VP4-VP3) и небольшой неструктурный белок VP5 (17 кДа) [10]. Полипротеин позже автокаталитически расщепляется на три полипептида: предшественника капсидного белка pVP2 (54 кДа), который в дальнейшем будет процессироваться в зрелую форму VP2 (48,5 кДа) самим VP2, каркасный белок VP3 (28 кДа) и сериновую протеазу VP4 (25 кДа) [11, 12]. VP2 отвечает за антигенную изменчивость, выступая в качестве нейтрализующего антигена. И VP2, и VP5 играют решающую роль в индуцируемом IBDV апоптозе в клетках-хозяевах. VP3 является внутренним капсидным белком и может индуцировать группоспецифические антитела [13–15]. Кроме того, VP3 связывается не только с VP1 и VP2, но также с вирусной геномной дцРНК, чтобы ингибировать распознавание вирусной дцРНК с помощью внутриклеточного рецептора опознавания паттерна MDA5, тем самым подавляя MDA5-зависимую продукцию интерферона- β (IFN- β) [16–19]. VP4 также может подавлять экспрессию интерферона типа I, взаимодействуя с глюкокортикоид-индуцированной лейциновой молнией (GILZ) [20]. Недавно было обнаружено, что VP4 способствует повышенной вирулентности vvIBDV по сравнению с классическим вирусом (cIBDV) [21]. Сегмент В имеет длину 2,8 т. п. н.; он кодирует VP1 (90 кДа), РНК-зависимый белок РНК-полимеразы (RdRp), который связан с геномом вируса, участвует в синтезе мРНК и репликации вируса, а также отвечает за вирулентность IBDV [22, 23].

ВРОЖДЕННЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА ИНФИЦИРОВАНИЕ IBDV

Врожденный иммунитет образует первую линию защиты от патогенной инфекции. Рецепторы распознавания паттернов, экспрессируемые почти во всех системных клетках, играют критическую роль в инициации врожденного иммунного ответа посредством распознавания PAMP, что приводит к продукции интерферонов типа I и III и других провоспалительных медиаторов (например, цитокинов, хемокинов и антимикробных пептидов). В опубликованных работах появляется все больше доказательств наличия воспалительной реакции в фабрициевой сумке кур, вызванной IBDV [24]. Как показывают результаты исследования некоторых авторов, через день после заражения IBDV в бурсе цыплят резко увеличивается количество клеток CD4+, CD8+ и макрофагов, повышается экспрессия провоспалительных цитокинов интерлейкина-1 β (IL-1 β), интерлейкина-6 (IL-6) и хемокина CXCL12, однако количество противовоспалительного цитокина TGF- β 4 снижается [25]. Сходным образом в селезенке кур, инфицированных

IBDV, увеличивался уровень мРНК провоспалительных цитокинов и хемокинов [26]. В исследовании А. Liu et al. подтверждена повышенная экспрессия фактора, ингибирующего миграцию макрофагов кур (chMIF) в первичных клетках бursy и клетках DT40, инфицированных vvIBDV. Кроме того, chMIF может способствовать транскрипции провоспалительных цитокинов в первично культивируемых макрофагах цыплят и индуцировать миграцию мононуклеарных клеток периферической крови, раскрывая механизм vvIBDV-опосредованной инициации провоспалительного ответа [27]. Недавнее исследование, сравнивающее транскрипционные профили цыплят породы белый леггорн различных инбредных линий, показало, что при инфицировании vvIBDV исход заболевания у птиц был разным – инфекция протекала с различной степенью тяжести, которая ассоциировалась со значительно усиленным воспалением, опосредованным хемокинами и цитокинами, регуляцией цитоскелета с помощью семейства клеточных сигнальных белков (Rho GTPases) [28]. Было обнаружено, что уровни транскрипции IL-1 β , IFN- β , каспазы-1 и цитозольного белка NLRP3 (криопирин) повышались в клетках DF-1, инфицированных IBDV, а нокдаун NLRP3 увеличивал вирусную нагрузку, это указывает на то, что инфекция активирует инфламмасому NLRP3 в DF-1 клетки [29]. Однако в этих исследованиях не было необходимых данных относительно ASC (атипические железистые клетки), каспаз-1 или -11, IL-1, IL-18 и расщепленного гасдермина на уровне белка, которые имеют решающее значение для определения возникновения воспалительных заболеваний и индукции последующего пироптоза. В настоящее время по-прежнему требуются убедительные экспериментальные данные для подтверждения индуцированной IBDV активации инфламмосом, а также возникновения пироптоза. В принципе, врожденный иммунитет кур служит первой линией защиты от IBD, включая воспалительную реакцию, которая в норме способствует фагоцитозу и клиренсу IBDV. Однако, если vvIBDV-инфекция вызывает острую воспалительную реакцию, полностью не поддающуюся контролю, чрезмерное воспаление может привести к цитокиновому шторму, что, в свою очередь, приводит к серьезным последствиям, таким как сепсис или даже гибель [30]. Несомненно, воспалительная реакция у цыплят с IBD тесно связана с тяжестью заболевания, а также со степенью поражения бursy.

Интерфероны являются наиболее важными факторами анти-IBDV в ответе организма [31]. Интерферон-стимулируемые гены (ISG), индуцируемые IFN типа I, могут влиять на жизненный цикл вируса на разных стадиях, таких как проникновение в клетку, репликация, транскрипция, сборка и высвобождение. Поскольку внутриклеточный рецептор опознавания паттерна RIG-I отсутствует в геноме кур, дцРНК IBDV в основном распознается через MDA5 и TLR3 [32, 33]. У цыплят, инфицированных vvIBDV, полученным из лимфоидных клеток DT40, экспрессия TLR1, TLR2, TLR3, TLR4 и TLR5 в бурсе увеличивалась [34]. Сходные результаты показали, что уровень мРНК chTLR3 повышался у цыплят, инфицированных полевым штаммом NN040124 IBDV, в клетках DF-1, а также в ткани бursy, но его нижестоящий эффектор IFN- β снижался на ранней стадии инфекции. Это говорит о том, что IBDV развивался с различными стратегиями ингибирования продукции IFN типа I, чтобы выжить в организме кур [35]. В отличие от кле-

ток HD11, инфицированных IBDV, экспрессия мРНК как в TLR3, так и в TLR7 (которые распознают одноцепочечную вирусную РНК) в бурсе снижалась. Различия в экспрессии TLR, наблюдаемые в разных исследованиях, могут быть связаны с разнообразием штаммов вируса, поскольку было обнаружено, что экспрессия TLR3 повышалась после заражения классическим IBDV, но снижалась после инфицирования вариантным IBDV [36].

Заражение IBDV вызывает дозозависимую активацию куриного MDA5 и IFN- β в куриных клетках HD11, а нокадаун экспрессии shMDA5 приводил к более высокому содержанию РНК IBDV и снижению экспрессии регуляторного фактора интерферона-3 (IRF-3) и IFN- β [37]. Было обнаружено, что экспрессия мРНК TLR1LB, TLR2A, TLR3, TLR4, TLR15 (и TLR21 в селезенке) и MDA5 в бурсе повышалась на ранних стадиях инфекции, тогда как экспрессия TLR1LA, TLR2B и TLR7 подавлялась. В то же время экспрессия противовирусных факторов IFN- α и IFN- γ и индуцированных интерфероном трансмембранных белков IFITM1, IFITM3 и IFITM5 усиливалась в бурсе кур, инфицированных IBDV, что свидетельствует о том, что инфекция запускала врожденный иммунный ответ хозяина [38]. Эти результаты показали, что как TLR3 (который обнаруживает вирусную дцРНК в эндосоме), так и MDA5 (который воспринимает цитозольную вирусную дцРНК) играют решающую роль в обнаружении генома IBDV, впоследствии инициируя развитие иммунных реакций организма в ответ на инфекцию.

Дефензины являются важными небольшими пептидами врожденного иммунитета, оказывающими прямое антимикробное действие на патогены (бактерии, грибки, простейшие и оболочечные вирусы), а также играющими определенную роль в иммуномодуляции [39]. Было обнаружено, что цыплята, иммунизированные векторной вакциной, экспрессирующей белок VP2 IBDV, вместе с куриным β -дефенсином-1 (AvBD1), имели более высокие уровни антител, чем птицы, привитые только одной вакциной. Это указывает на то, что AvBD1 оказывает адъювантное действие, тем самым стимулируя эффективность ДНК-вакцины [40]. Сообщалось, что введение куриных кишечных антимикробных пептидов (CIAMP) приводит к повышению титров антител у цыплят, иммунизированных вакциной против IBD. Это позволяет предположить, что CIAMP могут модулировать гуморальный иммунный ответ против IBDV.

Поскольку доказано, что врожденный иммунный ответ против IBD зависит от генетического фона кур, а степень напряженности врожденного иммунитета – от штамма вируса, одним из вариантов стратегии борьбы с заболеванием может стать разведение и селекция устойчивых к IBDV племенных цыплят, поэтому продолжение исследований в данном направлении будет актуальным.

АДАПТИВНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ОРГАНИЗМА КУР НА IBDV

Гуморальный иммунный ответ. Адаптивный иммунитет хозяина отвечает за специфическое распознавание и элиминацию вирусов на более поздней стадии инфекции после того, как врожденный иммунитет не смог полностью устранить патогены на ранней стадии заболевания. Гуморальный иммунный ответ в основном осуществляется В-лимфоцитами. К сожалению, незрелые В-клетки в фабрициевой сумке кур являются клетками-мишенями IBDV [41], и IBDV-индуцированный

апоптоз в В-лимфоцитах непосредственно приводит к серьезному истощению В-клеток в бурсе, что ведет к разрушению иммунной системы птиц. Как показывают результаты недавних исследований, заражение IBDV штамма LJ-5 (новый изолят vvIBDV) приводит к снижению индекса бursы, жизнеспособности В-лимфоцитов и уровня иммуноглобулинов (Ig), включая IgM и IgA в фабрициевой сумке и IgY в сыворотке [42]. С помощью секвенирования одноклеточной РНК (scRNA-seq) и проточной цитометрии было установлено, что популяция В-клеток в бурсе инфицированных IBDV цыплят резко уменьшилась по сравнению с контрольной группой, также заражение привело к снижению количества IgM⁺ и IgY⁺ В-клетки в фабрициевой сумке. Кроме того, было обнаружено, что IgY⁺ и IgA⁺ В-клетки были более многочисленными, чем IgM⁺, и что гены BLMP1 и IRF4, ответственные за переключение IgA, были высокоэкспрессированы у IBDV-инфицированных цыплят. Это указывает на то, что инфекция способствует секреции IgA в бурсе, а клетки IgY⁺ и IgA⁺ могут быть ответственны за продукцию антител против IBDV [43]. Несмотря на истощение незрелых В-клеток в бурсальной сумке цыплят из-за IBD, зрелые специфические В-клетки способны размножаться после контакта с вирусом и вызывать сильный гуморальный иммунный ответ у молодняка, перенесшего острую фазу заболевания. В недавнем исследовании была проведена сравнительная оценка патогенности малайзийского варианта IBDV и vvIBDV для цыплят, свободных от специфических патогенов (SPF), на основании макроскопических и гистопатологических поражений и определения вирусной нагрузки. Было установлено, что даже несмотря на то, что изучаемые штаммы IBDV различались по своей вирусной нагрузке, вирулентности и персистенции, оба могли вызывать значительный гуморальный ответ через 7 дней после инфицирования. Это говорит о том, что гуморальный иммунный ответ может играть решающую роль в контроле инфекции, вызванной IBDV [44].

Клеточный иммунный ответ в основном осуществляется Т-лимфоцитами. Повышенное количество Т-лимфоцитов и продукция родственных цитокинов и хемокинов в фабрициевой сумке цыплят, инфицированных IBDV, указывает на то, что клеточно-опосредованный иммунный ответ может быть вызван инфекцией IBD [45]. Сообщалось, что экспрессия цитокинов Т-хелперов 1 (Th1) – IFN- γ , IL-2 и IL-12p40 – увеличивалась в бурсе цыплят после заражения vvIBDV, но у птиц, инфицированных адаптированным к клеткам штаммом Ts IBDV, экспрессия цитокинов Th2 (IL-4, IL-5, IL-13 и IL-10) была значительно выше, чем цитокинов Th1. Это свидетельствует о том, что адаптированный к клеткам штамм Ts IBDV в основном индуцировал гуморальный иммунный ответ [46]. Интересны результаты, полученные S. Rautenschlein et al., которые показали, что при инфицировании IBDV у цыплят после хирургической тимэктомии (Tx) и применения препарата циклоспорина А (CsA), избирательно подавляющего функцию Т-клеток, происходили ингибирование экспрессии рецептора IL-2 и блокировка опосредованной IL-2 передачи сигнала, в результате антигенная нагрузка в бурсе была значительно выше, чем у интактных птиц. Однако апоптоз клеток у Tx-CsA-кур был снижен по сравнению с таковым у цыплят с нормальной функцией Т-клеток. Авторы считают, что разрушение клеток бursы, вызванное IBD, может быть опосредовано эффекторным

действием цитотоксических Т-лимфоцитов. Между тем количество фолликулов фабрициевой сумки увеличилось у Тх-CsА-цыплят относительно интактных птиц. Это указывает на то, что присутствие функциональных Т-клеток задерживает восстановление после вызванного IBDV истощения фолликулов бursы [47]. Кроме того, заражение цыплят IBDV увеличивает количество CD8+ Т-клеток в бурсе и селезенке, а экспрессия Fas-рецептора и Fas-лиганда (FasL), перфорина (PFN) и гранзимы А (GzmA) в этих органах значительно усилена [48]. До сих пор точный механизм, с помощью которого Т-клетки реагируют на инфекцию, вызванную IBDV, все еще неясен. Очень важно определить, несет ли IBDV доминантные защитные эпитопы для активации Т-клеток. Активированные Т-лимфоциты распознают эпитоп, представленный главным комплексом гистосовместимости птиц класса I (MHC I) инфицированных IBDV клеток, для индукции гибели клеток с последующим высвобождением вирусного антигена из разрушенных клеток, так что свободные вирусные антигены могут связываться со специфическими антителами с образованием комплекса антиген – антитело. Впоследствии они подвергаются фагоцитозу макрофагами путем опсонизации, опосредованной рецептором Fc, или прямого макропиноцитоза. Таким образом, иммунитет, определяемый Т-клетками, имеет решающее значение для элиминации IBDV иммунной системой птицы.

РЕАКЦИЯ ОРГАНИЗМА КУР НА ИНФИЦИРОВАНИЕ IBDV НА УРОВНЕ БЕЛКА

Лучшее понимание молекулярных механизмов вирусной инфекции будет очень полезно при разработке новых вакцин или противовирусных препаратов. Недавние сообщения об обширных и сложных связях между вирусом и хозяином на молекулярном уровне побудили исследователей к изучению сети взаимодействия вирус – хозяин и предложению «интерактомики вирус – хозяин» [49]. Нацеливание на клеточные факторы для антивирусной терапии станет новым подходом, который может решить проблему вирусных мутаций и резистентности. В последние годы был достигнут заметный прогресс в изучении взаимоотношений IBDV и организма, что облегчает поиск клеточных мишеней, которые могут ингибировать размножение вируса, обеспечивая теоретическую основу для разработки новых вакцин или противовирусных препаратов.

Контроль амплификации вирусного генома является эффективной стратегией организма для подавления репликации IBDV. Трансляционный эукариотический фактор инициации 4AII (eIF4AII) – клеточный фактор хозяина, участвующий в осуществлении трансляции большинства клеточных мРНК, – взаимодействует с VP1, чтобы ингибировать активность вирусной РНК-полимеразы в инфицированных IBDV клетках DF-1. Это приводит к снижению размножения IBDV, что указывает на подавляющую роль фактора хозяина eIF4AII в репликации вируса [50]. Сообщалось, что другой клеточный фактор – ядерный фактор 45 (NF45), который участвует в экспорте РНК и обеспечивает стабильность и трансляцию мРНК, – специфически локализуется с VP1, VP2 и VP3 в инфицированных IBDV клетках DF-1. Циклофилин А (CyPA) – повсеместно экспрессируемый белок, обладающий пептидил-пролил-цис-транс-изомеразной (PPIase) активностью, – играет важную роль в модифи-

кации белков, укладке, транспортировке и регуляции транскрипции. CyPA также участвует в инфекционных процессах, вызванных вирусом, посредством различных механизмов. В клетках, инфицированных IBDV, CyPA взаимодействует с VP4, подавляя репродукцию вируса. Существует мнение, что CyPA влияет на ферментативную активность VP4 или активирует врожденный иммунный ответ против IBDV, однако для определения его роли все еще требуются дополнительные доказательства. Точно так же в недавнем исследовании при изучении факторов хозяина, вовлеченных в инфекционный процесс при IBD, с применением секвенирования РНК было обнаружено, что белок 25, содержащий трехчастный мотив (TRIM25), взаимодействует с VP3 и опосредует его убиквитинирование и последующую деградацию, тем самым ограничивая размножение IBDV. Эти данные свидетельствуют о том, что TRIM25 является фактором, сдерживающим репликацию вируса [51].

Аутофагия представляет собой высококонсервативный цитоплазматический путь поддержания физиологической стабильности у эукариот, с помощью которого изолируются и удаляются нежелательные собственные материалы, при этом происходит их расщепление до аминокислот для повторного использования. Растущее число исследований установило противовирусную роль аутофагии в ответе организма на патогенную инфекцию. Взаимодействие VP2 IBDV с белком теплового шока 90 (Hsp90AA1) индуцирует аутофагию через путь Hsp90AA1-AKT-mTOR на ранних стадиях инфекции, а активированная аутофагия ингибирует репликацию вируса [52]. Недавно было обнаружено, что аутофагический грузовой рецептор p62 взаимодействует с VP2 IBDV, что усиливает индукцию аутофагии и способствует аутофагической деградации VP2. Это свидетельствует о том, что p62-опосредованная аутофагическая деградация VP2 может играть роль в представлении пептида VP2 с помощью MHC, чтобы инициировать адаптивный иммунный ответ. Следует отметить, что аутофагию, с помощью которой разлагаются инородные материалы (например, патогены), часто называют ксенофагией. В недавнем исследовании было установлено, что рецептор аутофагии SQSTM1 напрямую связывается с дцРНК IBDV через аминокислотные сайты R139 и K141 и вызывает аутофагическое разрушение вирусной РНК, тем самым подавляя репликацию IBDV [53]. Эти данные свидетельствуют о том, что селективная аутофагия вирусного генома хозяином (ксенофагия) играет решающую роль в контроле инфекции, вызванной IBDV.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то что для профилактики и борьбы с болезнями кур во всем мире реализуется программа вакцинации, до сих пор возникают спорадические вспышки IBD. Это указывает на то, что данная инфекция все еще представляет реальную угрозу для промышленного птицеводства. Таким образом, необходимо срочно разработать более эффективные и безопасные вакцины для контроля заболевания. Как показывают результаты некоторых исследований [54], цитокины chIL-2 и chIL-7 являются эффективными биологическими адьювантами, повышающими иммуногенность ДНК-вакцины против IBD, поэтому поиск новых адьювантов представляется актуальным направлением. При взаимодействии IBDV с хозяином некоторые клеточные белки играют противовирусную роль, обеспечивая защиту организма

посредством различных механизмов. Например, eIF4AII, NF45, Сура и TRIM25 подавляют репликацию IBDV, взаимодействуя с вирусными белками или репликационным комплексом, в то время как HSP90AA1, p62 и SQSTM1 ингибируют размножение IBDV, взаимодействуя с вирусными белками или геномами, для инициации аутофагии хозяина, что впоследствии индуцирует их репликацию. Необходимо и настоятельно рекомендуется проводить дальнейшие работы по изучению факторов рестрикции хозяина и их молекулярных механизмов во время инфицирования IBDV. Врожденный иммунитет играет важную роль в защите организма от IBDV и прямо или косвенно регулирует адаптивный иммунный ответ при IBD, что может служить ценным ориентиром для разработки противовирусных терапевтических средств для воздействия на клеточном уровне. Взаимодействие организма и IBDV все еще вызывает много вопросов, которые необходимо решить. Полное понимание молекулярного механизма ответа организма на вызванную IBDV инфекцию могло бы оказать большую помощь в разработке противовирусных стратегий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Mahgoub H. A. An overview of infectious bursal disease. *Arch. Virol.* 2012; 157 (11): 2047–2057. DOI: 10.1007/s00705-012-1377-9.
- Ingrao F., Rauw F., Lambrecht B., van den Berg T. Infectious bursal disease: a complex host-pathogen interaction. *Dev. Comp. Immunol.* 2013; 41 (3): 429–438. DOI: 10.1016/j.dci.2013.03.017.
- Wang W., He X., Zhang Y., Qiao Y., Shi J., Chen R., et al. Analysis of the global origin, evolution and transmission dynamics of the emerging novel variant IBDV (A2dB1b): the accumulation of critical aa-residue mutations and commercial trade contributes to the emergence and transmission of novel variants. *Transbound. Emerg. Dis.* 2022; 69 (5): e2832–e2851. DOI: 10.1111/tbed.14634.
- Islam M. R., Nooruzzaman M., Rahman T., Mumu T. T., Rahman M. M., Chowdhury E. H., et al. A unified genotypic classification of infectious bursal disease virus based on both genome segments. *Avian Pathol.* 2021; 50 (2): 190–206. DOI: 10.1080/03079457.2021.1873245.
- Nooruzzaman M., Hossain I., Rahman M. M., Uddin A. J., Mustari A., Parvin R., et al. Comparative pathogenicity of infectious bursal disease viruses of three different genotypes. *Microb. Pathog.* 2022; 169:105641. DOI: 10.1016/j.micpath.2022.105641.
- Fan L., Wu T., Wang Y., Hussain A., Jiang N., Gao L., et al. Novel variants of infectious bursal disease virus can severely damage the bursa of Fabricius of immunized chickens. *Vet. Microbiol.* 2020; 240:108507. DOI: 10.1016/j.vetmic.2019.108507.
- Shirokov D. A., Dubovoi A. S., Manuvera V. A., Samuseva G. N., Dmitrieva M. E., Lazarev V. N. Complete genome sequence of a novel very virulent strain of infectious bursal disease virus circulating in Russia. *Microbiol. Resour. Announc.* 2018; 7 (20):e01084-18. DOI: 10.1128/MRA.01084-18.
- Takeuchi O., Akira S. Innate immunity to virus infection. *Immunol. Rev.* 2009; 227 (1): 75–86. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00737.x.
- Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 2007; 449 (7164): 819–826. DOI: 10.1038/nature06246.
- Lombardo E., Maraver A., Espinosa I., Fernández-Arias A., Rodríguez J. F. VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology.* 2000; 277 (2): 345–357. DOI: 10.1006/viro.2000.0595.
- Irigoyen N., Castón J. R., Rodríguez J. F. Host proteolytic activity is necessary for infectious bursal disease virus capsid protein assembly. *J. Biol. Chem.* 2012; 287 (29): 24473–24482. DOI: 10.1074/jbc.M112.356113.
- Irigoyen N., Garriga D., Navarro A., Verdager N., Rodríguez J. F., Castón J. R. Autoproteolytic activity derived from the infectious bursal disease virus capsid protein. *J. Biol. Chem.* 2009; 284 (12): 8064–8072. DOI: 10.1074/jbc.M808942200.
- Qin Y., Xu Z., Wang Y., Li X., Cao H., Zheng S. J. VP2 of infectious bursal disease virus induces apoptosis via triggering oral cancer overexpressed 1 (ORAOV1) protein degradation. *Front. Microbiol.* 2017; 8:1351. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01351.
- Li Z., Wang Y., Xue Y., Li X., Cao H., Zheng S. J. Critical role for voltage-dependent anion channel 2 in infectious bursal disease virus-induced apoptosis in host cells via interaction with VP5. *J. Virol.* 2012; 86 (3): 1328–1338. DOI: 10.1128/JVI.06104-11.
- Lin W., Zhang Z., Xu Z., Wang B., Li X., Cao H., et al. The association of receptor of activated protein kinase C 1 (RACK1) with infectious bursal disease virus viral protein VP5 and voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2) inhibits apoptosis and enhances viral replication. *J. Biol. Chem.* 2015; 290 (13): 8500–8510. DOI: 10.1074/jbc.M114.585687.
- Maraver A., Oña A., Abaitua F., González D., Clemente R., Ruiz-Díaz J. A., et al. The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. *J. Virol.* 2003; 77 (11): 6438–6449. DOI: 10.1128/jvi.77.11.6438-6449.2003.
- Kochan G., Gonzalez D., Rodriguez J. F. Characterization of the RNA-binding activity of VP3, a major structural protein of infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* 2003; 148 (4): 723–744. DOI: 10.1007/s00705-002-0949-5.
- Deng T., Hu B., Wang X., Yan Y., Zhou J., Lin L., et al. DeSUMOylation of apoptosis inhibitor 5 by *Avibirnavirus* VP3 supports virus replication. *mBio.* 2021; 12 (4):e0198521. DOI: 10.1128/mBio.01985-21.
- Shirokov D. A., Manuvera V. A., Miroshina O. A., Dubovoi A. S., Samuseva G. N., Dmitrieva M. E., Lazarev V. N. Generation of recombinant VP3 protein of infectious bursal disease virus in three different expression systems, antigenic analysis of the obtained polypeptides and development of an ELISA test. *Arch. Virol.* 2020; 165 (7): 1611–1620. DOI: 10.1007/s00705-020-04650-2.
- Li Z., Wang Y., Li X., Li X., Cao H., Zheng S. J. Critical roles of glucocorticoid-induced leucine zipper in infectious bursal disease virus (IBDV)-induced suppression of type I interferon expression and enhancement of IBDV growth in host cells via interaction with VP4. *J. Virol.* 2013; 87 (2): 1221–1231. DOI: 10.1128/JVI.02421-12.
- He Z., Chen X., Fu M., Tang J., Li X., Cao H., et al. Infectious bursal disease virus protein VP4 suppresses type I interferon expression via inhibiting K48-linked ubiquitylation of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ). *Immunobiology.* 2018; 223 (4–5): 374–382. DOI: 10.1016/j.imbio.2017.10.048.
- Dulwich K. L., Asfor A., Gray A., Giotis E. S., Skinner M. A., Broadbent A. J. The stronger downregulation of *in vitro* and *in vivo* innate antiviral responses by a very virulent strain of infectious bursal disease virus (IBDV), compared to a classical strain, is mediated, in part, by the VP4 protein. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020; 10:315. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00315.
- Nouén C. L., Toquin D., Müller H., Raue R., Kean K. M., Langlois P., et al. Different domains of the RNA polymerase of infectious bursal disease virus contribute to virulence. *PLoS One.* 2012; 7 (1):e28064. DOI: 10.1371/journal.pone.0028064.
- Palmquist J. M., Khatir M., Cha R. M., Goddeeris B. M., Walcheck B., Sharma J. M. *In vivo* activation of chicken macrophages by infectious bursal disease virus. *Viral Immunol.* 2006; 19 (2): 305–315. DOI: 10.1089/vim.2006.19.305.
- Eldaghayes I., Rothwell L., Williams A., Withers D., Balu S., Davison F., Kaiser P. Infectious bursal disease virus: strains that differ in virulence differentially modulate the innate immune response to infection in the chicken bursa. *Viral Immunol.* 2006; 19 (1): 83–91. DOI: 10.1089/vim.2006.19.83.
- Rasoli M., Yeap S. K., Tan S. W., Roohani K., Kristeen-Teo Y. W., Alitheen N. B., et al. Differential modulation of immune response and cytokine profiles in the bursa and spleen of chickens infected with very virulent infectious bursal disease virus. *BMC Vet. Res.* 2015; 11:75. DOI: 10.1186/s12917-015-0377-x.
- Liu A., Li H., Qi X., Wang Q., Yang B., Wu T., et al. Macrophage migration inhibitory factor triggers inflammatory responses during very virulent infectious bursal disease virus infection. *Front. Microbiol.* 2019; 10:2225. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02225.
- Asfor A. S., Nazki S., Reddy V. R. A. P., Campbell E., Dulwich K. L., Giotis E. S., et al. Transcriptomic analysis of inbred chicken lines reveals infectious bursal disease severity is associated with greater bursal inflammation *in vivo* and more rapid induction of pro-inflammatory responses in primary bursal cells stimulated *ex vivo*. *Viruses.* 2021; 13 (5):933. DOI: 10.3390/v13050933.
- He Z., Ma Y., Wu D., Feng W., Xiao J. Protective effects of the NLRP3 inflammasome against infectious bursal disease virus replication in DF-1 cells. *Arch. Virol.* 2021; 166 (7): 1943–1950. DOI: 10.1007/s00705-021-05099-7.
- Xu Z. Y., Yu Y., Liu Y., Ou C. B., Zhang Y. H., Liu T. Y., et al. Differential expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory genes of layer chicken bursa after experimental infection with infectious bursal disease virus. *Poult. Sci.* 2019; 98 (11): 5307–5314. DOI: 10.3382/ps/pez312.
- Broto L., Romero N., Méndez F., Diaz-Beneitez E., Candelas-Rivera O., Fuentes D., et al. Type I interferon acts as a major barrier to the establishment of infectious bursal disease virus (IBDV) persistent infections. *J. Virol.* 2021; 95 (5): e02017-20. DOI: 10.1128/JVI.02017-20.
- Lee C. C., Wu C. C., Lin T. L. Chicken melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) recognizes infectious bursal disease virus infection and triggers MDA5-related innate immunity. *Arch. Virol.* 2014; 159 (7): 1671–1686. DOI: 10.1007/s00705-014-1983-9.

33. Chen R., Chen J., Xiang Y., Chen Y., Shen W., Wang W., et al. Differential modulation of innate antiviral profiles in the intestinal lamina propria cells of chickens infected with infectious bursal disease viruses of different virulence. *Viruses*. 2022; 14 (2):393. DOI: 10.3390/v14020393.
34. Quan R., Zhu S., Wei L., Wang J., Yan X., Li Z., Liu J. Transcriptional profiles in bursal B-lymphoid DT40 cells infected with very virulent infectious bursal disease virus. *Viol. J.* 2017; 14 (1):7. DOI: 10.1186/s12985-016-0668-2.
35. He X., Chen Y., Kang S., Chen G., Wei P. Differential regulation of chTLR3 by infectious bursal disease viruses with different virulence *in vitro* and *in vivo*. *Viral. Immunol.* 2017; 30 (7): 490–499. DOI: 10.1089/vim.2016.0134.
36. Rauf A., Khatri M., Murgja M. V., Jung K., Saif Y. M. Differential modulation of cytokine, chemokine and Toll like receptor expression in chickens infected with classical and variant infectious bursal disease virus. *Vet. Res.* 2011; 42:85. DOI: 10.1186/1297-9716-42-85.
37. Lee C. C., Wu C. C., Lin T. L. Role of chicken melanoma differentiation-associated gene 5 in induction and activation of innate and adaptive immune responses to infectious bursal disease virus in cultured macrophages. *Arch. Virol.* 2015; 160 (12): 3021–3035. DOI: 10.1007/s00705-015-2612-y.
38. Smith J., Sadeyen J. R., Butter C., Kaiser P., Burt D. W. Analysis of the early immune response to infection by infectious bursal disease virus in chickens differing in their resistance to the disease. *J. Virol.* 2015; 89 (5): 2469–2482. DOI: 10.1128/JVI.02828-14.
39. Gao X., Ding J., Liao C., Xu J., Liu X., Lu W. Defensins: the natural peptide antibiotic. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2021; 179:114008. DOI: 10.1016/j.addr.2021.114008.
40. Zhang H. H., Yang X. M., Xie Q. M., Ma J. Y., Luo Y. N., Cao Y. C., et al. The potent adjuvant effects of chicken beta-defensin-1 when genetically fused with infectious bursal disease virus VP2 gene. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2010; 136 (1–2): 92–97. DOI: 10.1016/j.vetimm.2010.02.018.
41. Vasconcelos A. C., Lam K. M. Apoptosis induced by infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.* 1994; 75 (Pt 7): 1803–1806. DOI: 10.1099/0022-1317-75-7-1803.
42. Huang X., Liu W., Zhang J., Liu Z., Wang M., Wang L., et al. Very virulent infectious bursal disease virus-induced immune injury is involved in inflammation, apoptosis, and inflammatory cytokines imbalance in the bursa of Fabricius. *Dev. Comp. Immunol.* 2021; 114:103839. DOI: 10.1016/j.dci.2020.103839.
43. Shah A. U., Li Y., Ouyang W., Wang Z., Zuo J., Shi S., et al. From nasal to basal: single-cell sequencing of the bursa of Fabricius highlights the IBDV infection mechanism in chickens. *Cell Biosci.* 2021; 11 (1):212. DOI: 10.1186/s13578-021-00728-9.
44. Aliyu H. B., Hamisu T. M., Hair Bejo M., Omar A. R., Ideris A. Comparative pathogenicity of Malaysian variant and very virulent infectious bursal disease viruses in chickens. *Avian Pathol.* 2022; 51 (1): 76–86. DOI: 10.1080/03079457.2021.2006604.
45. Kim I. J., You S. K., Kim H., Yeh H. Y., Sharma J. M. Characteristics of bursal T lymphocytes induced by infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 2000; 74 (19): 8884–8892. DOI: 10.1128/jvi.74.19.8884-8892.2000.
46. Liu H., Zhang M., Han H., Yuan J., Li Z. Comparison of the expression of cytokine genes in the bursal tissues of the chickens following challenge with infectious bursal disease viruses of varying virulence. *Viol. J.* 2010; 7:364. DOI: 10.1186/1743-422X-7-364.
47. Rautenschlein S., Yeh H. Y., Njenga M. K., Sharma J. M. Role of intra-bursal T cells in infectious bursal disease virus (IBDV) infection: T cells promote viral clearance but delay follicular recovery. *Arch. Virol.* 2002; 147 (2): 285–304. DOI: 10.1007/s705-002-8320-2.
48. Viswanathan K., Früh K. Viral proteomics: global evaluation of viruses and their interaction with the host. *Expert Rev. Proteomics.* 2007; 4 (6): 815–829. DOI: 10.1586/14789450.4.6.815.
49. Абгарян С. Р., Никитина Н. В., Семина А. Н. Молекулярно-биологическая диагностика респираторных болезней птиц. *Международный вестник ветеринарии.* 2019; (3): 11–15. DOI: 10.17238/issn2072-2419.2019.3.11.
- Abgarian S. R., Nikitina N. I., Semina A. N. Molecular-biological diagnostics of respiratory diseases in birds. *International Journal of Veterinary Medicine.* 2019; (3): 11–15. DOI: 10.17238/issn2072-2419.2019.3.11. (in Russ.)
50. Gao L., Li K., Zhong L., Zhang L., Qi X., Wang Y., et al. Eukaryotic translational initiation factor 4AII reduces the replication of infectious bursal disease virus by inhibiting VP1 polymerase activity. *Antiviral Res.* 2017; 139: 102–111. DOI: 10.1016/j.antiviral.2016.11.022.
51. Wang S., Yu M., Liu A., Bao Y., Qi X., Gao L., et al. TRIM25 inhibits infectious bursal disease virus replication by targeting VP3 for ubiquitination and degradation. *PLoS Pathog.* 2021; 17 (9):e1009900. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009900.
52. Hu B., Zhang Y., Jia L., Wu H., Fan C., Sun Y., et al. Binding of the pathogen receptor HSP90AA1 to avibirnavirus VP2 induces autophagy by inactivating the AKT-MTOR pathway. *Autophagy.* 2015; 11 (3): 503–515. DOI: 10.1080/15548627.2015.1017184.
53. Li Y., Hu B., Ji G., Zhang Y., Xu C., Lei J., et al. Cytoplasmic cargo receptor p62 inhibits avibirnavirus replication by mediating autophagic degradation of viral protein VP2. *J. Virol.* 2020; 94 (24):e01255-20. DOI: 10.1128/JVI.01255-20.
54. Huo S., Zhang J., Fan J., Wang X., Wu F., Zuo Y., Zhong F. Co-expression of chicken IL-2 and IL-7 enhances the immunogenicity and protective efficacy of a VP2-expressing DNA vaccine against IBDV in chickens. *Viruses.* 2019; 11 (5): 476. DOI: 10.3390/v11050476.

Поступила в редакцию / Receive 24.04.2023

Поступила после рецензирования / Revised 28.06.2023

Принята к публикации / Accepted 05.07.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ / INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Семина Анна Николаевна, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник, заведующий отделом диагностики и эпизоотологического анализа ВНИВИП, г. Санкт-Петербург, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-7641-9105>, e-mail: anna14.05@mail.ru.

Anna N. Semina, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Head of Department of Diagnostics and Epizootological Analysis, ARRVIPs, Saint Petersburg, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-7641-9105>, e-mail: anna14.05@mail.ru.



Способ получения и хранения гипериммунной сибиреязвенной сыворотки

С. В. Иванова, Л. А. Мельникова, А. П. Родионов, В. В. Евстифеев

ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»), г. Казань, Республика Татарстан, Россия

РЕЗЮМЕ

Сибирская язва — особо опасная инфекционная болезнь животных и человека, вызываемая спорообразующей бактерией *Bacillus anthracis*. В настоящее время данное заболевание широко распространено во многих странах мира. Некоторые регионы Российской Федерации являются эндемичными по сибирской язве. Большое число средств терапии, диагностики и профилактики сибиреязвенной инфекции разрабатываются на основе гипериммунных сывороток крови. Известные в настоящее время коммерческие сыворотки крови получают путем гипериммунизации лошадей, длящейся в течение 2 мес. и представляющей длительный и дорогостоящий процесс. Данный факт свидетельствует о необходимости разработки более быстрых и дешевых способов получения гипериммунных противосибиреязвенных сывороток крови, что и явилось целью работы. В опыте использовали живую культуру вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ *Bacillus anthracis*, который применяется в России для создания живых лекарственных препаратов против сибирской язвы животных. В качестве модели для получения сывороток крови были выбраны кролики. В результате проведенной работы подобран способ гипериммунизации кроликов, включающий внутривенное введение антигена в нарастающем объеме по схеме: I инъекция — 0,5 см³; II инъекция — 1 см³; III инъекция — 2 см³ в дозе 100 млн м. к./гол. в 1 см³ с интервалом между введениями 4 сут. Указанная схема дала возможность получить сыворотку крови с высоким титром антител, равным 14 log₂. Для долгосрочного хранения полученной сыворотки отработан режим ее лиофилизации, позволивший достичь остаточной влажности готового препарата в 2%. При изучении длительности хранения лиофилизированной сыворотки было установлено, что исходная активность и физико-химические свойства препарата сохраняются в течение 30 мес.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, гипериммунизация, сыворотка, антиген, сибирская язва, антитела

Благодарность: Работа выполнена за счет средств ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» в рамках научно-исследовательской работы по теме «Разработка серологической тест-системы для исследования напряженности иммунитета у животных, вакцинированных против сибирской язвы в реакции непрямой геммагглютинации».

Для цитирования: Иванова С. В., Мельникова Л. А., Родионов А. П., Евстифеев В. В. Способ получения и хранения гипериммунной сибиреязвенной сыворотки. *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (3): 215–221. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-215-221.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Родионов Александр Павлович, кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник лаборатории коллекции штаммов микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», 420075, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, Научный городок-2, e-mail: alexandrjetspets@gmail.com.

Method of obtaining and storing hyperimmune anthrax serum

S. V. Ivanova, L. A. Melnikova, A. P. Rodionov, V. V. Evstifeev

FSBSI "Federal Center for Toxicological, Radiation, and Biological Safety" (FSBSI "FCTRBS-ARRVI"), Kazan, Republic of Tatarstan, Russia

SUMMARY

Anthrax is a highly dangerous disease of animals and humans caused by the spore-forming bacterium *Bacillus anthracis*. Currently, the disease is widespread in many countries of the world. Many regions of the Russian Federation are anthrax-endemic. A large number of anthrax treatment, diagnosis and prevention tools are developed using hyperimmune serum. Currently known commercial hyperimmune sera are produced by 2-month long immunization of horses, which is a long and expensive process. This suggests the need to develop faster and cheaper ways to produce anti-anthrax hyperimmune sera; such possible ways became the objective of this study. A live culture of *Bacillus anthracis* 55-VNIIVViM vaccine strain, used to produce live vaccines against animal anthrax, was used in the experiments. Rabbits were used as animal models. Based on the findings the method of rabbit immunization was selected. The optimal method included intravenous injection of the antigen in increasing amounts according to the following scheme: injection I — 0.5 cm³; injection II — 1 cm³; injection III — 2 cm³ at a dose of 100 million mc/animal in 1 cm³, with 4-day interval between injections. This scheme made it possible to produce the serum with a high antibody titer equal to 14 log₂. For long-term storage of the serum produced, the freeze-drying modes were optimized, giving 2% residual moisture content of the finished product. The analysis of the freeze-dried serum storage terms showed that the initial activity and physico-chemical properties of the product are maintained for 30 months.

Keywords: *Bacillus anthracis*, immunization, serum, antigen, anthrax, antibodies

Acknowledgements: The work was financed by the "FSBSI Federal Centre for Toxicological, Radiation and Biological Safety" as part of the research work devoted to the development of HA test kit for testing of animals vaccinated against anthrax for immunity levels.

For citation: Ivanova S. V., Melnikova L. A., Rodionov A. P., Evstifeev V. V. Method of obtaining and storing hyperimmune anthrax serum. *Veterinary Science Today*. 2023; 12 (3): 215–221. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-215-221.

© Иванова С. В., Мельникова Л. А., Родионов А. П., Евстифеев В. В., 2023

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

For correspondence: Alexander P. Rodionov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Junior Researcher, Laboratory for Collection of Strains of Microorganisms, FSBSI "FCRBS-ARRVI", 420075, Russia, Republic of Tatarstan, Kazan, Nauchnyi gorodok-2, e-mail: alexandrsvetspets@gmail.com.

ВВЕДЕНИЕ

Сибирская язва – смертельно опасное инфекционное заболевание, вызываемое спорообразующей бактерией *Bacillus anthracis* [1, 2]. На сегодняшний день вспышки данной инфекции продолжают регистрировать как среди животных, так и среди людей во многих странах мира [3–5]. Кроме того, существует постоянный риск заноса заболевания с территории других государств [6]. По данным Всемирной организации здравоохранения животных, в 2019 г. сибирскую язву регистрировали в 46 странах мира, в 2020 г. – в 23, в 2021 г. – в 22, в 2022 г. – в 16 [7]. Многие регионы Российской Федерации являются эндемичными по сибирской язве [8, 9]. В основном заболевание носит спорадический характер, вовлекая в инфекционный процесс небольшое число животных. Однако произошедшая на Ямале вспышка сибирской язву демонстрирует риск осложнения ситуации [10, 11]. Данный факт увеличивает актуальность разработки и получения средств диагностики, профилактики и терапии этой особо опасной инфекции.

В процессе разработки тест-системы «Набор определения титра антител в сыворотках крови животных, вакцинированных против сибирской язву в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА)» [12] необходимо проводить ее стандартизацию, в том числе определять активность антигена. Кроме того, при определении уровня антител у вакцинированных животных требуется постановка контрольной реакции с заведомо позитивной сывороткой крови. Впоследствии данная сыворотка должна будет входить в состав разработанного диагностического набора.

Известные в настоящее время коммерческие гипериммунные сыворотки крови получают путем длительной (в течение 2 мес.) гипериммунизации лошадей [13]. Данный факт свидетельствует о необходимости поиска более быстрых и дешевых способов получения гипериммунных противосибиреязвенных сывороток крови. Новизна настоящей работы заключается в том, что предложена схема гипериммунизации кроликов, позволяющая получать в короткий срок высокоактивную противосибиреязвенную гипериммунную сыворотку крови.

Исходя из этого, была поставлена цель разработать способ получения гипериммунной сибиреязвенной сыворотки крови, которая будет служить в качестве контроля при постановке серологической реакции для определения уровня антител у вакцинированных против сибирской язву животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штамм. В качестве иммунизирующего антигена использовали вакцинный штамм 55-ВНИИВВиМ *B. anthracis* (pX01+/pX02–).

Питательные среды. Для культивирования *B. anthracis* использовали мясо-пептонный агар (МПА) и мясо-пептонный бульон (МПБ), 5%-й кровяной агар, 12%-й желатин, обезжиренное молоко и бульон Хоттингера производства ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (Россия).

Лабораторные животные. С целью получения гипериммунной сибиреязвенной сыворотки были отобраны кролики породы шиншилла, прошедшие 30-дневный карантин, весом 2,5–3,0 кг. Всего использовали 15 животных, из которых сформировали 3 группы по 5 гол. в каждой.

При проведении экспериментов на животных были соблюдены требования Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях.

Реактивы и тест-системы. Для смыва культуры с поверхности агара, а также в качестве разбавителя при выполнении РНГА применяли 0,9%-й раствор натрия хлорида (ООО «Гротекс», Россия).

При постановке РНГА использовали сибиреязвенный антигенный эритроцитарный диагностикум (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», Россия).

Методы. Биологические свойства штамма изучали согласно МУК 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язву»¹.

Суспензию для иммунизации лабораторных животных концентрацией 100 и 500 млн м. к. в 1 см³, в зависимости от схемы, готовили из штамма, выращенного на МПА при температуре 37 °С в течение 2 сут.

Контроль титра нарастания антител проводили каждые 3 сут перед следующим введением антигена в РНГА, которую ставили согласно инструкции к используемому диагностикуму в U-образных серологических макропанелях (ООО «МиниМед», Россия). Во все лунки макропанели многоканальной пипеткой вносили по 0,2 см³ 0,9%-го раствора натрия хлорида. В первые лунки рядов вносили полученную и контрольную (негативную) сыворотки крови в объеме 0,2 см³, последовательными переносами получали двукратные разведения. После приготовления соответствующих разведений сывороток во все лунки вносили 0,05 см³ (50 мкл) суспензии сибиреязвенного антигенного эритроцитарного диагностикума. Панели осторожно шуттелировали для смешивания компонентов реакции и оставляли при температуре от 10 до 20 °С на 1,5–2,0 ч. После экспозиции производили учет реакции.

Взятие крови у животных-продуцентов проводили тотально из сердца. Кровь собирали в стерильные сте-

¹ МУК 4.2.2413-08 Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язву: методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2009. 69 с. Режим доступа: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293752/4293752010.pdf>.

клянные цилиндры, стенки которых смачивали 0,9%-м раствором натрия хлорида, помещали в термостат для свертывания на 45–60 мин, после чего сгусток отделяли от стенок цилиндра круговыми движениями стеклянной стерильной палочкой и ставили в холодильник при температуре 4 °С на 24 ч. Отделившуюся сыворотку крови декантировали со сгустка стерильной пипеткой после проверки активности.

Лиофилизацию сывороток крови проводили на установке LZ-9.2 (Frigera, Чехия).

Полученную сыворотку оценивали по следующим показателям: внешний вид, цвет, наличие или отсутствие примесей, растворимость, активность в процессе длительного хранения, массовая доля влаги в лиофилизированном препарате.

Внешний вид, цвет, наличие или отсутствие примесей регистрировали визуально.

Для определения растворимости во флаконы с сывороткой вносили 1 см³ 0,9%-го раствора натрия хлорида. После этого флаконы встряхивали и наблюдали за растворением сухой массы.

Активность полученной сыворотки крови в процессе длительного хранения в лиофилизированном виде при температуре 4 °С определяли через 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 30, 36 и 42 мес. в РНГА с эритроцитарным антигенным сибирезвенным диагностикумом. Значения активности сыворотки учитывали в log₂.

Определение массовой доли влаги лиофилизированной сыворотки осуществляли согласно ГОСТ 24061-2012².

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием U-критерия Манна – Уитни. Результаты исследований представлены в виде $M \pm S_D$, где M – среднее значение, S_D – стандартное отклонение. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,01$ (после пересчета на число сравнений) [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Первым этапом работы было изучение основных биологических свойств штамма 55-ВНИИВВиМ *B. anthracis*.

После посева штамма на МПА и МПБ и культивирования в течение 24 ч определяли культуральные, морфологические, тинкториальные свойства, регистрировали наличие или отсутствие подвижности.

На МПА наблюдали плоские матово-серые шероховатые (R-форма) колонии (рис. 1А) с затемненным центром и бахромчатой периферией с локонообразными отростками (рис. 1В).

Через 24 ч после посева в МПБ среда осталась прозрачной, на дне образовался рыхлый осадок в виде комочка ваты (рис. 1С). При встряхивании пробирки бульон не мутнел, осадок с трудом разбивался на мелкие хлопья.

Из бульонной культуры делали мазки, окрашивали по Граму и микроскопировали. В мазках обнаруживали типичные цепочки, состоящие из сибирезвенных палочек, окрашенных грамположительно (рис. 1D).

При проведении исследования установили, что штамм 55-ВНИИВВиМ обладает типичными для своего вида биологическими свойствами (табл. 1).

² ГОСТ 24061-2012 Средства лекарственные биологические лиофилизированные для ветеринарного применения. Метод определения массовой доли влаги. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200103299>.

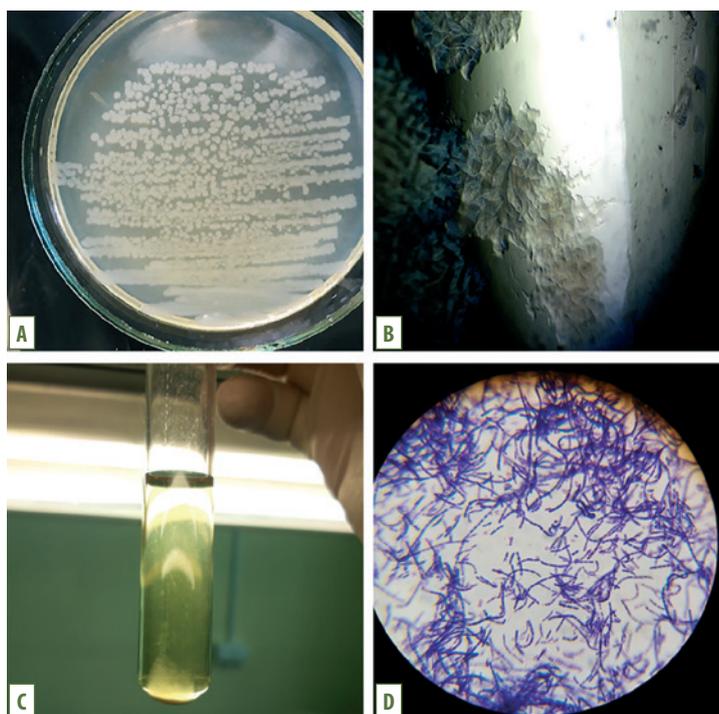


Рис. 1. Морфологические признаки штамма 55-ВНИИВВиМ *B. anthracis*: А – форма колоний в R-форме на МПА; В – локонообразные отростки колоний *B. anthracis* (8 × 40); С – характерные признаки роста *B. anthracis* в МПБ в виде комочка ваты; D – морфология клеток *B. anthracis*, окрашенных по Граму

Fig. 1. *B. anthracis* 55-VNIIVViM morphology: A – R-shaped colonies on MPA; B – *B. anthracis* 'curly hair' colonies (8 × 40); C – *B. anthracis* typical 'cotton wool'-like growth in MPB; D – morphology of Gram-stained *B. anthracis* cells

Таблица 1
Характеристика основных биологических свойств штамма 55-ВНИИВВиМ *B. anthracis*

Table 1
Major biological properties of *B. anthracis* 55-VNIIVViM strain

№ п/п	Показатель (свойство)	Значение показателя штамма 55-ВНИИВВиМ <i>B. anthracis</i>	Значение показателя по определителю Берджи
1	Подвижность	–	–
2	Гемолитические свойства	–	–
3	Протеолитические свойства: 12%-й желатин обезжиренное молоко	+ +	+ +
4	Капсулообразование	–	–
5	Чувствительность к пенициллину	+	+
6	Спорообразование	+	+

«+» – наличие свойства (positive result); «–» – отсутствие свойства (negative result).

Следующим этапом работы было изыскание оптимальной схемы иммунизации лабораторных животных для получения активной гипериммунной сибирезвенной сыворотки. Подготовленный антиген вводили тремя способами: 1) в нарастающем объеме внутривенно: I инъекция – 0,5 см³; II инъекция – 1,0 см³; III инъекция – 2,0 см³ в дозе 100 млн м. к./гол. в 1 см³ с интервалом между введениями 4 сут; 2) внутривенно

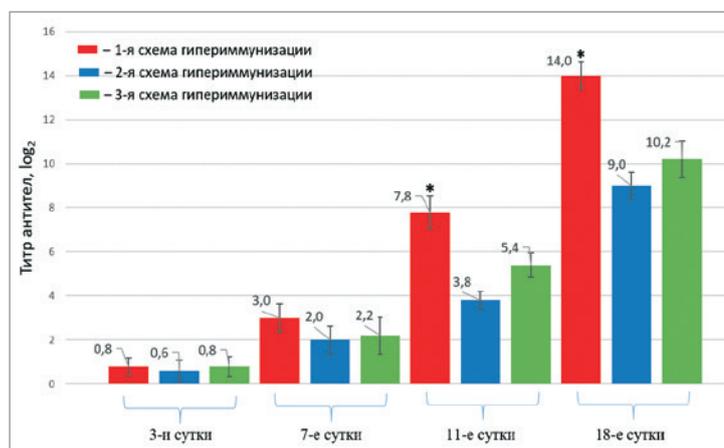


Рис. 2. Динамика нарастания титра специфических антител в сыворотках крови гипериммунизированных кроликов (* статистически значимое различие, $p < 0,01$)

Fig. 2. Specific antibody titre dynamics in sera of hyperimmunized rabbits (* statistically significant difference, $p < 0.01$)

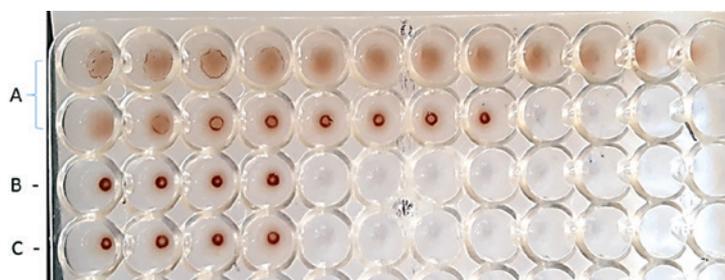


Рис. 3. Активность полученной гипериммунной сыворотки крови кроликов в РНГА с эритроцитарным сибиреязвенным антигеном: А – реакция с полученной гипериммунной сывороткой крови (титр антител 14 log₂); В – реакция с нормальной сывороткой крови (сыворотка крови неиммунизированного животного); С – реакция с физиологическим раствором

Fig. 3. Activity of produced hyperimmune rabbit sera tested by HA test using RBC anthrax antigen:

A – reaction to produced hyperimmune serum (antibody titre 14 log₂); B – reaction to normal serum (serum of non-immunized animal); C – reaction to saline solution

Таблица 2

Параметры различных режимов лиофилизации сыворотки крови

Table 2

Different modes of serum freeze-drying

Дни	Режим № 1		Режим № 2	
	время	этап	время	этап
1-й	11:30	1. Включение аппарата	8:00	1. Включение аппарата
	12:00	2. Загрузка сывороток в лиофильную сушку при -35 °С	8:30	2. Загрузка сывороток в лиофильную сушку при -35 °С
	16:00	3. Отключение охлаждения при -37 °С	16:00	3. Отключение охлаждения при -36 °С
2-й	8:00	1. Включение нагрева (t в камере +10 °С)	8:00	1. Включение нагрева (t в камере +10 °С)
	11:00	2. Отключение аппарата (t в камере +35 °С)	11:00	2. Отключение аппарата (t в камере +35 °С)

однократно в дозе 500 млн м. к./гол. в 1 см³; 3) внутривенно двукратно в дозе 100 млн м. к./гол. в 1 см³ вдоль позвоночного столба в пять точек с каждой стороны с интервалом между введениями 5 сут.

В процессе иммунизации кроликов каждые 3 сут проводили контроль динамики нарастания титра антител путем взятия крови и постановки РНГА. Применение вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ возбудителя сибирской язвы в качестве антигена позволило получить активную иммунную сибиреязвенную сыворотку. Результаты определения активности гипериммунной сыворотки крови кроликов при трех схемах гипериммунизации представлены на рисунке 2.

В течение всего периода гипериммунизации лабораторных животных наблюдали нарастание титра антител. Наибольший уровень специфических антител в сыворотках крови кроликов наблюдали при иммунизации, выполненной по первой схеме: после введения антигена к 18-м сут титр достигал значения 14 log₂, что равнозначно разведению сыворотки 1:16384 (рис. 3). Поэтому данную схему в дальнейшем использовали при разработках диагностических препаратов.

Сыворотки крови, используемые в качестве компонентов диагностических тест-систем, лучше сохраняют активность и легче транспортируются в лиофилизированном состоянии [15]. С этой целью были проведены исследования по подбору режима лиофилизации. Для этого лиофильную сушку сывороток крови осуществляли при двух различных режимах (табл. 2).

В результате сравнения двух режимов сублимационной сушки было установлено, что режим № 1 позволяет лиофилировать сыворотку в однородную консистенцию белого цвета с кремовым оттенком (рис. 4А). В то время как режим № 2, в котором процесс сублимации занимал более длительное время, приводил к излишней сухости полученного препарата (рис. 4В).

После лиофилизации был проведен контроль качества полученной сыворотки, физико-химические и биологические показатели которой представлены в таблице 3.

При проверке стабильности полученной лиофилизованной сыворотки крови в процессе длительного хранения при температуре 4 °С было установлено, что первоначальный титр сохраняется в течение не менее 30 мес. с последующим снижением активности до 10 log₂ через 36 мес. после лиофилизации (рис. 5). Следовательно, сублимационная сушка гипериммунной сыворотки крови кроликов позволяет сохранять высокую активность препарата в течение длительного времени.

ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении работ была получена сыворотка крови кроликов против сибирской язвы с высоким титром антител. Поиск способа изготовления данного лиофилизованного препарата связан с необходимостью применения его в качестве контроля разработанного сибиреязвенного диагностикума. Многими группами исследователей продемонстрирована эффективность использования мышей, морских свинок, коз и лошадей для получения противосибиреязвенных сывороток [16–21]. В нашем эксперименте в качестве модели служили кролики. Это позволило получить большой объем сыворотки по сравнению с мышами или морскими свинками (количество сыворотки от

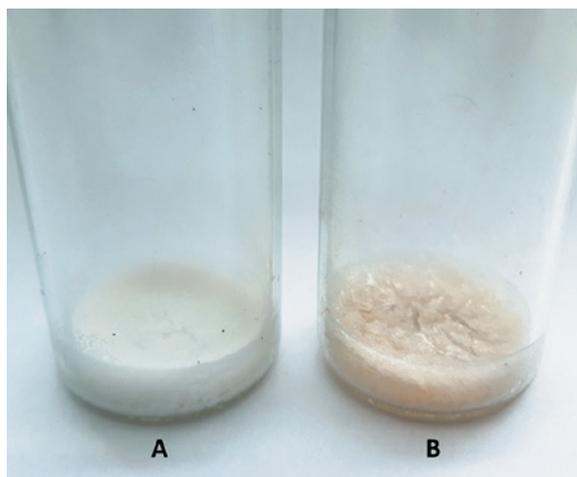


Рис. 4. Визуальная оценка лиофилизированной гипериммунной сыворотки крови: А – режим сублимации № 1; В – режим сублимации № 2

Fig. 4. Visual evaluation of freeze-dried hyperimmune serum: А – freeze-drying mode 1; В – freeze-drying mode 2

одной мыши колеблется в пределах 0,5 мл). Тогда как более крупные животные, например козы и лошади, требуют больших затрат на инфраструктуру для их содержания.

Получение моно- и поликлональных глобулинов и сывороток крови к антигенам *B. anthracis* широко представлено в научной литературе [22–26]. Однако получение поликлональных сывороток к антигенам живых клеток возбудителя сибирской язвы освещается не так широко. В работе M. Caldwell et al. описано получение сыворотки крови лошадей при гипериммунизации штаммом Sterne (pX01+/pX02–) *B. anthracis* [21]. В ходе нашего эксперимента сыворотку также получали на живые бактериальные клетки штамма 55-ВНИИВВиМ (pX01+/pX02–) *B. anthracis*, так как она должна применяться в первую очередь в качестве положительного контроля диагностикума и воспроизводить свойства сывороток иммунизированных животных. Использование живых клеток бактерии штамма 55-ВНИИВВиМ в нашем случае оправданно, поскольку на его основе создаются вакцины против сибирской язвы в России [10]. В недавнем исследовании было показано, что живые вакцины против сибирской язвы обеспечивают формирование напряженного и длительного иммунитета к основным антигенам возбудителя [27].

При иммунизации кроликов клетками штамма 55-ВНИИВВиМ (pX01+/pX02–) *B. anthracis* в опыте были испытаны три схемы гипериммунизации. Лучший синтез антител происходил при внутривенном последовательном введении антигена через каждые 4 дня: при первом введении – 0,5 см³, при втором – 1,0 см³, при третьем – 2,0 см³ с концентрацией 100 млн спор в 1 см³. В результате проведенной гипериммунизации была получена сыворотка крови с уровнем антител, равным 14 log₂, что соответствует титру 1:16384. В аналогичных исследованиях M. Caldwell et al. 12-кратную гипериммунизацию проводили введением лошадям 1,0 см³ спорной вакцины из штамма Sterne *B. anthracis* один раз в месяц, что позволяло получить титр антител на уровне 16,25 log₂ [21]. В своем эксперименте С. D. Kelly et al. иммунизировали коз очищенным rPA (рекомбинантным протективным антигеном *B. anthracis*) с но-

Таблица 3
Физико-химические и биологические показатели лиофилизированной сыворотки крови

Table 3
Physico-chemical and biological parameters of freeze-dried serum

Показатель	Характеристика сыворотки
Внешний вид	Сухая масса в виде таблетки
Цвет	Белого цвета с кремовым оттенком
Растворимость	При добавлении 1 см ³ 0,9%-го раствора NaCl растворяется в течение 1–3 мин
Активность	Агглютинирует антигенный эритроцитарный сибирезвенный диагностикум в разведении 1:16384
Массовая доля влаги, %	2,0



Рис. 5. Активность лиофилизированной гипериммунной сыворотки крови кроликов в процессе длительного хранения при 4 °C (* статистически значимое различие, $p < 0,01$)

Fig. 5. Activity of freeze-dried hyperimmune rabbit serum during long-term storage at 4 °C (* statistically significant difference, $p < 0.01$)

вым мурамилдипептидным адъювантом в дозе 100 мкг конъюгата. Введение антигена проводили на 1, 14, 28 и 56-й день. В результате авторам удалось получить сыворотку крови с титром анти-РА антител, равным 1:16000 [16]. Таким образом, использованная нами схема позволила в более короткий срок получить высокий уровень антител.

Одним из лучших способов консервации и хранения сывороток крови признается лиофилизация [15]. Поэтому для сохранения полученной сыворотки были испытаны два режима сублимационной сушки. Установили, что режим № 1 позволил лиофилировать сыворотку в однородную консистенцию белого цвета с кремовым оттенком, в то время как режим № 2 привел к излишней сухости полученного препарата. В процессе сублимационного высушивания сыворотки крови какие-либо защитные среды не применялись. В работе R. Brogna et al. также продемонстрировано, что лиофилизация сыворотки с протектором и без него не влияют на сохранность иммуноглобулинов [28]. Титр антител в лиофилизированной сыворотке крови сохранялся на исходном уровне в течение 30 мес.

Разработанный способ получения сыворотки крови гипериммунизированных против сибирской язвы кроликов обладает рядом преимуществ (низкая стоимость,

простота производства, высокий титр антител) и представляет собой достойную альтернативу дорогостоящим методам изготовления гипериммунных сывороток крови лошадей. Предлагаемая технология получения сыворотки может быть использована при разработке специфических диагностических препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы разработан способ получения высокоактивной гипериммунной противосибиреязвенной сыворотки крови кроликов с титром антител, равным $14 \log_2$. Отработан режим лиофилизации полученной сыворотки, позволивший добиться остаточной влажности готового препарата в 2%. Установлено, что длительность хранения лиофилизированной сыворотки крови без потери ее первоначальной активности и физико-химических свойств составляет 30 мес.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Seid K., Shiferaw A. M., Yesuf N. N., Derso T., Sisay M. Livestock owners' anthrax prevention practices and its associated factors in Sekota Zuria district, Northeast Ethiopia. *BMC Vet. Res.* 2020; 16 (1):39. DOI: 10.1186/s12917-020-2267-0.
- Иванова С. В., Родионов А. П., Мельникова Л. А. Мониторинг факторов потенциальной опасности возникновения вспышек сибирской язвы. *Иппология и ветеринария.* 2021; 1 (39): 93–100. EDN: RBOFZY.
- Cossaboom C. M., Khaiseb S., Haufiku B., Katjuanjoo P., Kannyinga A., Mbai K., et al. Anthrax epizootic in wildlife, Bwabwata National Park, Namibia, 2017. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25 (5): 947–950. DOI: 10.3201/eid2505.180867.
- Muturi M., Gachohi J., Mwatondo A., Lekooloo I., Gakuya F., Bett A., et al. Recurrent anthrax outbreaks in humans, livestock, and wildlife in the same locality, Kenya, 2014–2017. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2018; 99 (4): 833–839. DOI: 10.4269/ajtmh.18-0224.
- Mwakapeje E. R., Høget S., Fyumagwa R., Nonga H. E., Mdegela R. H., Skjerve E. Anthrax outbreaks in the humans – livestock and wildlife interface areas of Northern Tanzania: a retrospective record review 2006–2016. *BMC Public Health.* 2018; 18:106. DOI: 10.1186/s12889-017-5007-z.
- Noordhuizen J., Surborg H., Smulders F. J. On the efficacy of current biosecurity measures at EU borders to prevent the transfer of zoonotic and livestock diseases by travellers. *Vet. Q.* 2013; 33 (3): 161–171. DOI: 10.1080/01652176.2013.826883.
- WAHIS: World Animal Health Information System. Режим доступа: <https://wahis.woah.org>.
- Ivanova S. V., Melnikova L. A., Rodionov A. P., Makaev Kh. N., Safina G. M., Murtazina G. Kh., et al. Analysis of the epizootic situation and improvement of the scheme for the specific prevention of anthrax. *Int. J. Res. Pharm. Sci.* 2020; 11 (1): 949–952. DOI: 10.26452/ijrps.v11i1.1919.
- Pisarenko S. V., Eremenko E. I., Ryazanova A. G., Kovalev D. A., Buravtseva N. P., Aksenova L. Yu., et al. Genotyping and phylogenetic location of one clinical isolate of *Bacillus anthracis* isolated from a human in Russia. *BMC Microbiol.* 2019; 19:165. DOI: 10.1186/s12866-019-1542-3.
- Liskova E. A., Egorova I. Y., Selyaninov Y. O., Razheva I. V., Gladkova N. A., Toropova N. N., et al. Reindeer anthrax in the Russian Arctic, 2016: climatic determinants of the outbreak and vaccination effectiveness. *Front. Vet. Sci.* 2021; 8:668420. DOI: 10.3389/fvets.2021.668420.
- Ezhova E., Orlov D., Suhonen E., Kaverin D., Mahura A., Gennadinik V., et al. Climatic factors influencing the anthrax outbreak of 2016 in Siberia, Russia. *Ecohealth.* 2021; 18 (2): 217–228. DOI: 10.1007/s10393-021-01549-5.
- Иванов А. В., Макаев Х. Н., Мельникова Л. А., Барбарова Л. А., Муртазина Г. Х., Иванова С. В., Хисамутдинов А. Г. Способ получения эритроцитарного сибиреязвенного антигена, способ получения контрольной положительной сыворотки для набора определения антител в сыворотке крови животных, вакцинированных против сибирской язвы, в реакции непрямой гемагглютинации и набор для определения антител. Патент № 2599035 Российская Федерация, МПК С12N 1/20 (2006.01), G01N 33/531 (2006.01). ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». № 2015128403/15. Заявл. 13.07.2015. Опубл. 10.10.2016. Бюл. № 28.
- Романов Г. И., Маничев А. А., Саленко Л. С., Степанова В. В., Захаров Д. Г., Комелина Л. И. и др. Способ изготовления сыворотки против сибирской язвы. Патент № 1347224 Российская Федерация. МПК А 61 К39/40. Всеоюзный государственный научно-контрольный институт ветпрепаратов. № 4066843/13. Заявл. 08.05.1986. Опубл. 20.11.1995.

- Баврина А. П. Современные правила применения параметрических и непараметрических критериев в статистическом анализе медико-биологических данных. *Медицинский альманах.* 2021; 1 (66): 64–73. EDN: IZXMBZ.

- Fissore D., McCoy T. Editorial: freeze-drying and process analytical technology for pharmaceuticals. *Front. Chem.* 2018; 6:622. DOI: 10.3389/fchem.2018.00622.
- Kelly C. D., O'Loughlin C., Gelder F. B., Peterson J. W., Sower L. E., Cirino N. M. Rapid generation of an anthrax immunotherapeutic from goats using a novel non-toxic muramyl dipeptide adjuvant. *J. Immune Based Ther. Vaccines.* 2007; 5:11. DOI: 10.1186/1476-8518-5-11.
- Beedham R. J., Turnbull P. C., Williamson E. D. Passive transfer of protection against *Bacillus anthracis* infection in a murine model. *Vaccine.* 2001; 19 (31): 4409–4416. DOI: 10.1016/s0264-410x(01)00197-9.
- Kobiler D., Gozes Y., Rosenberg H., Marcus D., Reuveny S., Altboum Z. Efficiency of protection of guinea pigs against infection with *Bacillus anthracis* spores by passive immunization. *Infect. Immun.* 2002; 70 (2): 544–560. DOI: 10.1128/IAI.70.2.544-550.2002.
- Herrmann J. E., Wang S., Zhang C., Panchal R. G., Bavari S., Lyons C. R., et al. Passive immunotherapy of *Bacillus anthracis* pulmonary infection in mice with antisera produced by DNA immunization. *Vaccine.* 2006; 24 (31–32): 5872–5880. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.04.065.
- Reuveny S., White M. D., Adar Y. Y., Kafri Y., Altboum Z., Gozes Y., et al. Search for correlates of protective immunity conferred by anthrax vaccine. *Infect. Immun.* 2001; 69 (5): 2888–2893. DOI: 10.1128/IAI.69.5.2888-2893.2001.
- Caldwell M., Hathcock T., Brock K. V. Passive protection against anthrax in mice with plasma derived from horses hyper-immunized against *Bacillus anthracis* Sterne strain. *PeerJ.* 2017; 5:e3907. DOI: 10.7717/peerj.3907.
- Plotkin S., Grabenstein J. D. Countering anthrax: vaccines and immunoglobulins. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 46 (1): 129–136. DOI: 10.1086/523578.
- Kummerfeldt C. E. Raxibacumab: potential role in the treatment of inhalational anthrax. *Infect. Drug. Resist.* 2014; 7: 101–109. DOI: 10.2147/IDR.S47305.
- Chitlaru T., Altboum Z., Reuveny S., Shafferman A. Progress and novel strategies in vaccine development and treatment of anthrax. *Immunol. Rev.* 2011; 239 (1): 221–236. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00969.x.
- Schneemann A., Manchester M. Anti-toxin antibodies in prophylaxis and treatment of inhalation anthrax. *Future Microbiol.* 2009; 4 (1): 35–43. DOI: 10.2217/17460913.4.1.35.
- Huang E., Pillai S. K., Bower W. A., Hendricks K. A., Guarnizo J. T., Hoyle J. D., et al. Antitoxin treatment of inhalation anthrax: a systematic review. *Health Secur.* 2015; 13 (6): 365–377. DOI: 10.1089/hs.2015.0032.
- Firstova V. V., Shakhova A. S., Riabko A. K., Silkina M. V., Zeninskaya N. A., Romanenko Y. O., et al. Characterization of the adaptive immune response of donors receiving live anthrax vaccine. *PLoS One.* 2021; 16 (12):e0260202. DOI: 10.1371/journal.pone.0260202.
- Brogna R., Oldenhof H., Sieme H., Figueiredo C., Kerrinnes T., Wolkers W. F. Increasing storage stability of freeze-dried plasma using trehalose. *PLoS One.* 2020; 15 (6):e0234502. DOI: 10.1371/journal.pone.0234502.

REFERENCES

- Seid K., Shiferaw A. M., Yesuf N. N., Derso T., Sisay M. Livestock owners' anthrax prevention practices and its associated factors in Sekota Zuria district, Northeast Ethiopia. *BMC Vet. Res.* 2020; 16 (1):39. DOI: 10.1186/s12917-020-2267-0.
- Ivanova S. V., Rodionov A. P., Melnikova L. A. Monitoring the potential hazards of anthrax outbreaks. *Hippology and veterinary.* 2021; 1 (39): 93–100. EDN: RBOFZY. (in Russ.)
- Cossaboom C. M., Khaiseb S., Haufiku B., Katjuanjoo P., Kannyinga A., Mbai K., et al. Anthrax epizootic in wildlife, Bwabwata National Park, Namibia, 2017. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25 (5): 947–950. DOI: 10.3201/eid2505.180867.
- Muturi M., Gachohi J., Mwatondo A., Lekooloo I., Gakuya F., Bett A., et al. Recurrent anthrax outbreaks in humans, livestock, and wildlife in the same locality, Kenya, 2014–2017. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2018; 99 (4): 833–839. DOI: 10.4269/ajtmh.18-0224.
- Mwakapeje E. R., Høget S., Fyumagwa R., Nonga H. E., Mdegela R. H., Skjerve E. Anthrax outbreaks in the humans – livestock and wildlife interface areas of Northern Tanzania: a retrospective record review 2006–2016. *BMC Public Health.* 2018; 18:106. DOI: 10.1186/s12889-017-5007-z.
- Noordhuizen J., Surborg H., Smulders F. J. On the efficacy of current biosecurity measures at EU borders to prevent the transfer of zoonotic and livestock diseases by travellers. *Vet. Q.* 2013; 33 (3): 161–171. DOI: 10.1080/01652176.2013.826883.
- WAHIS: World Animal Health Information System. Available at: <https://wahis.woah.org>.
- Ivanova S. V., Melnikova L. A., Rodionov A. P., Makaev Kh. N., Safina G. M., Murtazina G. Kh., et al. Analysis of the epizootic situation and

improvement of the scheme for the specific prevention of anthrax. *Int. J. Res. Pharm. Sci.* 2020; 11 (1): 949–952. DOI: 10.26452/ijrps.v11i1.1919.

9. Pisarenko S. V., Eremenko E. I., Ryazanova A. G., Kovalev D. A., Buravtseva N. P., Aksenova L. Yu., et al. Genotyping and phylogenetic location of one clinical isolate of *Bacillus anthracis* isolated from a human in Russia. *BMC Microbiol.* 2019; 19:165. DOI: 10.1186/s12866-019-1542-3.

10. Liskova E. A., Egorova I. Y., Selyaninov Y. O., Razheva I. V., Gladkova N. A., Toropova N. N., et al. Reindeer anthrax in the Russian Arctic, 2016: climatic determinants of the outbreak and vaccination effectiveness. *Front. Vet. Sci.* 2021; 8:668420. DOI: 10.3389/fvets.2021.668420.

11. Ezhova E., Orlov D., Suhonen E., Kaverin D., Mahura A., Gennadinik V., et al. Climatic factors influencing the anthrax outbreak of 2016 in Siberia, Russia. *Ecohealth.* 2021; 18 (2): 217–228. DOI: 10.1007/s10393-021-01549-5.

12. Ivanov A. V., Makaev Kh. N., Melnikova L. A., Barbarova L. A., Murtagina G. Kh., Ivanova S. V., Khisamutdinov A. G. Method of obtaining erythrocyte antigen of anthrax antigen, method of obtaining control positive serum for kit of detection of antibodies in the blood serum of animals vaccinated against anthrax, in the reaction of indirect hemagglutination and kit for detection of antibodies. Patent No. 2599035 Russian Federation, Int. Cl. C12N 1/20 (2006.01), G01N 33/531 (2006.01). FSBSI "FCTRBS-ARRVI". Application: 2015128403/15. Date of filing: 13.07.2015. Date of publication: 10.10.2016. Bull. No. 28. (in Russ.)

13. Romanov G. I., Manichev A. A., Salenko L. S., Stepanova V. V., Zakharov D. G., Komelina L. I., et al. Method for producing serum against anthrax. Patent No. 1347224 Russian Federation, Int. Cl. C12N 1/20. Vsesojuznyj gosudarstvennyj nauchnokontrol'nyj institut vetpreparatov. Application: 4066843/13. Date of filing: 08.05.1986. Date of publication: 20.11.1995. (in Russ.)

14. Bavrina A. P. Modern rules for the use of parametric and nonparametric tools in the statistical analysis of biomedical data. *Medical Almanac.* 2021; 1 (66): 64–73. EDN: IZKMBZ. (in Russ.)

15. Fissore D., McCoy T. Editorial: freeze-drying and process analytical technology for pharmaceuticals. *Front. Chem.* 2018; 6:622. DOI: 10.3389/fchem.2018.00622.

16. Kelly C. D., O'Loughlin C., Gelder F. B., Peterson J. W., Sower L. E., Cirino N. M. Rapid generation of an anthrax immunotherapeutic from goats using a novel non-toxic muramyl dipeptide adjuvant. *J. Immune Based Ther. Vaccines.* 2007; 5:11. DOI: 10.1186/1476-8518-5-11.

17. Beedham R. J., Turnbull P. C., Williamson E. D. Passive transfer of protection against *Bacillus anthracis* infection in a murine model. *Vaccine.* 2001; 19 (31): 4409–4416. DOI: 10.1016/s0264-410x(01)00197-9.

18. Kobiler D., Gozes Y., Rosenberg H., Marcus D., Reuveny S., Altboum Z. Efficiency of protection of guinea pigs against infection with *Bacillus anthracis* spores by passive immunization. *Infect. Immun.* 2002; 70 (2): 544–560. DOI: 10.1128/IAI.70.2.544-550.2002.

19. Herrmann J. E., Wang S., Zhang C., Panchal R. G., Bavari S., Lyons C. R., et al. Passive immunotherapy of *Bacillus anthracis* pulmonary infection in mice with antisera produced by DNA immunization. *Vaccine.* 2006; 24 (31–32): 5872–5880. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.04.065.

20. Reuveny S., White M. D., Adar Y. Y., Kafri Y., Altboum Z., Gozes Y., et al. Search for correlates of protective immunity conferred by anthrax vaccine. *Infect. Immun.* 2001; 69 (5): 2888–2893. DOI: 10.1128/IAI.69.5.2888-2893.2001.

21. Caldwell M., Hathcock T., Brock K. V. Passive protection against anthrax in mice with plasma derived from horses hyper-immunized against *Bacillus anthracis* Sterne strain. *PeerJ.* 2017; 5:e3907. DOI: 10.7717/peerj.3907.

22. Plotkin S., Grabenstein J. D. Countering anthrax: vaccines and immunoglobulins. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 46 (1): 129–136. DOI: 10.1086/523578.

23. Kummerfeldt C. E. Raxibacumab: potential role in the treatment of inhalational anthrax. *Infect. Drug. Resist.* 2014; 7: 101–109. DOI: 10.2147/IDR.S47305.

24. Chitlaru T., Altboum Z., Reuveny S., Shafferman A. Progress and novel strategies in vaccine development and treatment of anthrax. *Immunol. Rev.* 2011; 239 (1): 221–236. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00969.x.

25. Schneemann A., Manchester M. Anti-toxin antibodies in prophylaxis and treatment of inhalation anthrax. *Future Microbiol.* 2009; 4 (1): 35–43. DOI: 10.2217/17460913.4.1.35.

26. Huang E., Pillai S. K., Bower W. A., Hendricks K. A., Guarnizo J. T., Hoyle J. D., et al. Antitoxin treatment of inhalation anthrax: a systematic review. *Health Secur.* 2015; 13 (6): 365–377. DOI: 10.1089/hs.2015.0032.

27. Firstova V. V., Shakhova A. S., Riabko A. K., Silkina M. V., Zeninskaya N. A., Romanenko Y. O., et al. Characterization of the adaptive immune response of donors receiving live anthrax vaccine. *PLoS One.* 2021; 16 (12): e0260202. DOI: 10.1371/journal.pone.0260202.

28. Brogna R., Oldenhof H., Sieme H., Figueiredo C., Kerrinnes T., Wolkers W. F. Increasing storage stability of freeze-dried plasma using trehalose. *PLoS One.* 2020; 15 (6): e0234502. DOI: 10.1371/journal.pone.0234502.

Поступила в редакцию / Received 17.02.2023

Поступила после рецензирования / Revised 20.03.2023

Принята к публикации / Accepted 15.06.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Иванова Светлана Викторовна, кандидат биологических наук, заведующий центром коллективного пользования ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-4378-8569>, e-mail: 9274281396@mail.ru.

Мельникова Лилия Арсентьевна, кандидат ветеринарных наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории коллекции штаммов микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-0159-3843>, e-mail: vnivi@mail.ru.

Родионов Александр Павлович, кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник лаборатории коллекции штаммов микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-0853-5678>, e-mail: alexandrvtspets@gmail.com.

Евстифеев Виталий Валерьевич, доктор биологических наук, доцент, главный научный сотрудник отделения вирусологических и ультраструктурных исследований ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-9882-3475>, e-mail: evstifeev@vnivi.ru.

Svetlana V. Ivanova, Candidate of Science (Biology), Head of the Center of Collective Use, FSBSI "FCTRBS-ARRVI", Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-4378-8569>, e-mail: 9274281396@mail.ru.

Lilia A. Melnikova, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Leading Researcher, Laboratory for Collection of Strains of Microorganisms, FSBSI "FCTRBS-ARRVI", Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-0159-3843>, e-mail: vnivi@mail.ru.

Alexander P. Rodionov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Junior Researcher, Laboratory for Collection of Strains of Microorganisms, FSBSI "FCTRBS-ARRVI", Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-0853-5678>, e-mail: alexandrvtspets@gmail.com.

Vitaliy V. Evstifeev, Doctor of Science (Biology), Associate Professor, Chief Researcher, Department of Virological and Ultrastructural Research, FSBSI "FCTRBS-ARRVI", Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-9882-3475>, e-mail: evstifeev@vnivi.ru.



Значение РСК и ПЦР в диагностике экспериментальной инфекции кроликов, вызванной *Chlamydia psittaci*

В. В. Евстифеев^{1,3}, Ф. М. Хусаинов¹, С. И. Яковлев¹, Р. И. Шангараев¹, В. И. Еремец²

¹ ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»),

г. Казань, Республика Татарстан, Россия

² ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» (ФГБНУ ВНИТИП),

пос. Биокомбината, Московская обл., Россия

³ ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н. Э. Баумана» (ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ),

г. Казань, Республика Татарстан, Россия

РЕЗЮМЕ

Проведена индикация специфических хламидийных антител в реакции связывания комплемента и генома хламидий методом полимеразной цепной реакции у укротных крольчих при экспериментальной инфекции, вызванной *Chlamydia psittaci*. Развитие инфекционного процесса у зараженных кроликов сопровождалось повышением температуры тела и появлением респираторных симптомов и было подтверждено наличием в их крови специфических хламидийных антител и патологическими родами. При исследовании парных сывороток крови кроликов в реакции связывания комплемента выявили нарастание титров специфических хламидийных антител, которые на седьмые сутки после заражения варьировались в пределах 1:7,5; на четырнадцатые сутки средняя их концентрация была равна 1:40, и к тридцатым суткам средний титр увеличился до 1:60. Однако подтвердить хламидийную этиологию неблагоприятных исходов окрота экспериментально зараженных кроликов при исследовании проб патологических материалов, полученных из урогенитального тракта исследуемых животных, методом полимеразной цепной реакции и микроскопией мазков-отпечатков не удалось. При этом молекулярно-генетические исследования проб внутренних органов (печень) мертворожденных крольчат позволили выявить геном хламидий, в результате чего была подтверждена хламидийная этиология патологического исхода окрота кроликов. Следовательно, при прижизненной постановке диагноза на хламидиоз такой ретроспективный метод, как реакция связывания комплемента с хламидийным антигеном, имеет диагностическую ценность.

Ключевые слова: хламидиоз, *Chlamydia psittaci*, полимеразная цепная реакция, кролики, серологические исследования

Для цитирования: Евстифеев В. В., Хусаинов Ф. М., Яковлев С. И., Шангараев Р. И., Еремец В. И. Значение РСК и ПЦР в диагностике экспериментальной инфекции кроликов, вызванной *Chlamydia psittaci*. *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (3): 222–227. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-222-227.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Для корреспонденции: Яковлев Сергей Игоревич, кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник лаборатории вирусных антропоонозов животных ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», 420075, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, Научный городок-2, e-mail: arena176@rambler.ru.

Role of CFT and PCR in diagnosis of *Chlamydia psittaci* in experimentally infected rabbits

V. V. Evstifeev^{1,3}, F. M. Khusainov¹, S. I. Yakovlev¹, R. I. Shangaraev¹, V. I. Eremets²

¹ FSBSI "Federal Center for Toxicological, Radiation, and Biological Safety" (FSBSI "FCTRBS-ARRV1"), Kazan, Republic of Tatarstan, Russia

² FSBI "All-Russian Research and Technological Institute of Biological Industry" (VNIITIP), pos. Biokombinata, Moscow Oblast, Russia

³ FSBEI HE "Kazan State Academy of Veterinary Medicine by N. E. Bauman" (FSBEI HE Kazan SAVM), Kazan, Republic of Tatarstan, Russia

SUMMARY

Specific antibodies against chlamydia were detected using complement fixation test and chlamydia genome was detected using polymerase chain reaction in pregnant rabbits experimentally infected with *Chlamydia psittaci*. The infected rabbits developed a fever and respiratory signs and the infection was confirmed by specific antibodies against chlamydia detected in their blood and by abnormalities in rabbit kindling. Complement fixation test of paired rabbit sera revealed an increase in the titers of specific antibodies against chlamydia, which on Day 7 post infection varied within 1:7.5; on Day 14, mean concentration was 1:40 and by Day 30 mean titer increased to 1:60. However, when pathological materials from the urogenital tract of the experimental animals were tested in polymerase chain reaction and in smear microscopy, it was impossible to confirm that there is an etiological link between chlamydia and kindling problems in experimental animals. At the same time, molecular and genetic tests of internal organs (liver) sampled from stillborn baby rabbits revealed the chlamydia genome, thus, proving chlamydia involvement into the pathological kindling. Therefore, such a retrospective method as complement fixation test with a chlamydia antigen is of high diagnostic value for lifetime chlamydia diagnosis.

Keywords: chlamydiosis, *Chlamydia psittaci*, polymerase chain reaction, rabbits, serological tests

For citation: Evstifeev V. V., Khusainov F. M., Yakovlev S. I., Shangaraev R. I., Eremets V. I. Role of CFT and PCR in diagnosis of *Chlamydia psittaci* in experimentally infected rabbits. *Veterinary Science Today*. 2023; 12 (3): 222–227. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-222-227.

© Евстифеев В. В., Хусаинов Ф. М., Яковлев С. И., Шангараев Р. И., Еремец В. И., 2023

Conflict of interest: The authors declare no conflict of financial/non-financial interests associated with the article.

For correspondence: Sergey I. Yakovlev, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Junior Researcher, Laboratory for Viral Anthrozoosis in Animals, FSBSI "FCRBS-ARRVI", 420075, Russia, Republic of Tatarstan, Kazan, ul. Nauchny gorodok-2, e-mail: arena176@rambler.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Развитие молекулярной биологии, произошедшее в последние десятилетия и, как следствие, создание новых постгеномных технологий привело к разработке методов индикации генома возбудителей, которые позволили значительно усовершенствовать лабораторную диагностику инфекционных заболеваний, в том числе и животных. Одним из таких методов, который приобрел широкое распространение, явилась полимеразная цепная реакция (ПЦР). Ее высокая чувствительность и специфичность, достигающая, по данным некоторых авторов, 99,9% [1–3] и превосходящая все существующие до этого времени методы, а также доступность оборудования для проведения анализа обусловили повсеместное внедрение ПЦР при диагностике инфекционных заболеваний [4–7].

В последнее десятилетие XX века были секвенированы геномы практически всех значимых возбудителей инфекционных болезней животных. Доступность баз данных нуклеотидных последовательностей генов и совершенствование биоинформационных методов, наряду с прогрессом в области генетической инженерии и искусственным синтезом белков, сделавшим возможным процесс получения полипептидной цепи из аминокислот, привели к тому, что синтез специфических праймеров стал рутинной операцией.

Опираясь на высокую специфичность и чувствительность методов, основанных на амплификации нуклеотидов *in vitro*, обнаружение генома возбудителей приобрело главенствующую роль при постановке диагноза, отодвинув все остальные методы диагностики, в том числе и ретроспективную диагностику.

Распространение и доступность метода повлекли за собой изменение диагностических алгоритмов, окончательным звеном которых, не требующим дополнительного подтверждения, стала ПЦР, а значимость серологических методов была сведена лишь к постановке предварительного диагноза и мониторинговым исследованиям с обязательным подтверждением одним из прямых методов выявления антигена или генома хламидий в ПЦР¹.

Однако научным сотрудникам, медицинским и ветеринарным врачам, а также лабораторным работникам, занимающимся диагностикой инфекционных заболеваний, знакома такая ситуация, когда зачастую ретроспективными методами, чаще в реакции связывания комплемента (РСК) или иммуноферментном анализе (ИФА), выявлялись диагностические титры специфических антител в крови клинически больных животных [8–11]. При этом происходило их нарастание в парных сыворотках в два раза и более, что говорило

об активном инфекционном процессе, а не о перенесенном заболевании, а в ПЦР результат исследований был отрицательным [12–15].

Таким образом, действуя на основании «Методических указаний по лабораторной диагностике хламидийных инфекций у животных», которые отводят ретроспективным методам лишь роль предварительной диагностики, диагноз на хламидиоз не подтверждался. В результате очень часто, ввиду отрицательных результатов ПЦР, в хозяйствах, занимающихся племядрожай, мероприятия по ликвидации и профилактике хламидиоза не проводились, что обуславливало бесконтрольное распространение хламидийной инфекции [16–19]. Это происходило еще и потому, что других методов диагностики, кроме ПЦР, которые выявляют хламидии, антигены или ДНК хламидий в исследуемом материале, как прописано в методических указаниях, в арсенале ветеринарных лабораторий попросту нет.

В главе 3.3.1 действующего «Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных» Всемирной организации здравоохранения животных (ВОАИ)² для идентификации возбудителя хламидиоза четко рекомендовано использование методов, основанных на ПЦР и ИФА (для выявления антигена). Однако диагностических тест-систем для ИФА, выявляющих антиген хламидий, на рынке ветеринарных препаратов РФ нет.

Такая ситуация привела к тому, что ПЦР стала единственным доступным методом в практике ветеринарных лабораторий, на основании которого ставится окончательный диагноз на хламидийную инфекцию у сельскохозяйственных животных. Исходя из этого, цель работы заключалась в определении значения РСК и ПЦР в диагностике экспериментальной инфекции кроликов, вызванной *Chlamydia psittaci*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для заражения использовали штамм *C. psittaci* «250», депонированный в коллекцию микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», выделенный из патологического материала абортированного плода коровы в Куйбышевской области в 1973 году, культивируемый на развивающихся куриных эмбрионах с инфекционным титром $10^{-6.5} \text{ LD}_{50}/0,3 \text{ см}^3$ [20].

Исследование проводили на 5 сукрольных кроликах.

Стерильность (неконтаминированность) патологического материала для реизоляции определяли на питательных средах: мясо-пептонном бульоне (МПБ), мясо-пептонном агаре (МПА), мясо-пептонном печеночном бульоне (МППБ, Китта – Тароцци), среде Сабуро.

Концентрацию специфических антител к возбудителю хламидийной инфекции в крови экспериментально

¹ Методические указания по лабораторной диагностике хламидийных инфекций у животных: утв. департаментом ветеринарии 30.06.1999 № 13-7-2/643. Режим доступа: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293757/4293757190.htm>.

² Avian chlamydiosis. In: WOAH. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Режим доступа: <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access>.

инфицированных кроликов определяли в РСК с применением «Набора антигенов и сывороток для серологической диагностики хламидиозов сельскохозяйственных животных» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», Россия).

Первоначально для исключения спонтанной хламидийной инфекции у крольчих взяли пробы биоматериала для исследования в РСК с хламидийным антигеном и в ПЦР со специфическим праймером. На следующем этапе опыта крольчих скрестили с самцами. Через 3–7 сут после скрещивания 4 самок заразили вирулентной культурой хламидий. Инфекционный материал в виде 10%-й очищенной суспензии элементарных телец хламидий вводили животным внутривентрально в объеме 1,0 см³. Одна особь служила контролем.

Через 23–30 сут после заражения оценивали результаты исхода сукрольности. Потомство, полученное от крольчих, оценивали визуально, проводя ростовые измерения и диагностические исследования на хламидиоз с целью подтверждения этиологии при наличии патологических нарушений репродуктивной функции инфицированных животных.

Микроскопические исследования включали в себя отбор проб, приготовление мазков-отпечатков, их окраску карбол-фуксином по методу Стемпа и изучение микропрепарата под иммерсионной системой светового микроскопа при увеличении 100х.

Забор проб от крольчих осуществляли в соответствии с правилами взятия образцов для ПЦР-исследований. Соскоб со слизистой влажной инфицированных животных проводили урогенитальными зондами, после чего полученные образцы помещали в стерильные пробирки с транспортной средой. Взятие проб для микроскопии производили также урогенитальными зондами, после чего отобранный материал наносили на предметные стекла для изготовления мазков-отпечатков.

Все манипуляции с животными проводили в строгом соответствии с межгосударственными стандартами по содержанию и уходу за лабораторными животными, а также согласно требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях.

Молекулярно-генетические исследования осуществляли методом ПЦР. Обнаружение ДНК хламидий в образцах, отобранных от зараженных животных, проводили с применением тест-системы «ХЛА-КОМ» для диагностики хламидиоза животных и птиц методом ПЦР (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), предназначенной для выявления ДНК микроорганизмов семейства *Chlamydiaceae* в биологическом материале.

Экстракцию ДНК из исследуемого материала осуществляли при помощи комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Детекцию продуктов амплификации производили методом электрофореза в агарозном геле с использованием набора «ЭФ» для приготовления агарозного геля (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Результаты интерпретировали на основании наличия или отсутствия на электрофореграмме специфической полосы амплифицированной ДНК.

Изоляцию хламидий из патологических и клинических материалов осуществляли на развивающихся эм-

брионах кур 6-суточного возраста. Для этого из печени мертворожденных (по 2 плода от каждой крольчихи) крольчат готовили 20%-е суспензии, которыми в последующем инфицировали развивающиеся эмбрионы кур в желточный мешок. Эмбрионы, павшие ранее 4-х сут после заражения, выбраковывались (неспецифика). От эмбрионов, павших на 4–14-е сут, отбирались желточные оболочки, из них делали мазки-отпечатки, которые окрашивали по модифицированному методу Стемпа и исследовали под иммерсионной системой светового микроскопа с целью выявления элементарных телец хламидий в виде розовых точек на зеленом фоне препарата.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Работа была выполнена в отделении вирусологии ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».

Первым этапом работы явилась оценка общего состояния исследуемых животных.

При наблюдении за животными, проводимом до оплодотворения и в течение 3–7 сут после оплодотворения, а также до заражения, отметили, что состояние крольчих было в пределах физиологической нормы, о чем свидетельствовали показания температуры тела (38,5–39,5 °С) и поведение животных.

Исследования сывороток крови кроликов в РСК с хламидийным антигеном показали отсутствие специфических антител. При проведении ПЦР в образцах клинического материала от этих животных также не выявили наличия генома хламидий.

До начала опыта были проведены клинический осмотр 4 самцов кроликов, с которыми в дальнейшем было проведено спаривание подопытных крольчих, а также аналогичные лабораторные исследования на спонтанную хламидийную инфекцию. Результаты тоже были отрицательными.

Как показали термометрические измерения, заражение животных вирулентным штаммом хламидий вызвало кратковременное повышение температуры тела у всех 4 подопытных крольчих, которое началось на 2-е сут после инфицирования и продолжалось до 6-х сут, когда средняя температура тела по группе была равна 39,62 °С. В последующие дни температура начала стабилизироваться. Кроме того, заражение отразилось на общем состоянии крольчих. Начиная с 3-х сут животные отказывались от корма, их шерстный покров был взъерошенным, они были малоподвижны. На 5-е сут у трех инфицированных кроликов (№ 1, 2 и 3) развилась кашель.

Результаты исхода сукрольности после заражения вирулентной культурой хламидий представлены в таблице 1.

У трех животных инфицирование привело к мертворождению. У крольчихи № 3 из шести рожденных крольчат выжили только четыре. Доля выживших животных по группе составила 18%. У контрольной особи родилось 6 здоровых крольчат.

Следующим этапом работы было изучение динамики формирования гуморального иммунитета у крольчих. Результаты серологических исследований сывороток крови животных опытной и контрольной групп представлены в таблице 2.

Установлено, что до заражения в крови всех кроликов не выявлено антител к хламидийному антигену. Следовательно, у них отсутствовал специфический

противохламидийный иммунитет, что было важно для чистоты эксперимента. На 7-е сут после заражения в сыворотке крови крольчих опытной группы были выявлены комплементсвязывающие антитела, средний титр которых составил 1:7,5. В последующем наблюдали повышение их концентрации. Так, на 14-е сут средний титр был равен 1:40 и к 30-м сут увеличился до 1:60. Повышение уровня антител в парных сыворотках крови инфицированных кроликов свидетельствует о развитии инфекционного процесса хламидийной этиологии. В крови контрольного животного на протяжении всего исследования комплементсвязывающих антител выявлено не было.

С целью проведения микроскопических и молекулярно-генетических исследований по выявлению элементарных телец и ДНК хламидий на 30-е сут после заражения, когда прошли окролы у всех крольчих, были отобраны пробы соскобов со слизистой оболочки влагалища инфицированных животных и пробы из внутренних органов мертворожденных и здоровых крольчат (печень).

Результаты исследования плодов и клинических материалов, взятых после окрота, а также реизоляции хламидий из патологических материалов обобщены в таблице 3.

В ходе проведения микроскопических исследований в мазках, полученных из влагалища инфицированных крольчих, хламидий обнаружено не было. При микроскопии мазков-отпечатков, приготовленных из внутренних органов мертворожденных крольчат, наблюдали наличие элементарных телец возбудителя хламидиоза. При постановке ПЦР в образцах из слизистой влагалища крольчих ДНК хламидий не обнаружено. В пробах печени мертворожденных крольчат методом ПЦР был выявлен генетический материал хламидий, относящихся к виду *C. psittaci*. Аналогичные исследования патологического материала, полученного от контрольного кролика, дали отрицательные результаты.

Для идентификации возбудителя и подтверждения хламидийной этиологии наблюдаемых у крольчих па-

Таблица 1
Влияние экспериментальной инфекции, вызванной *C. psittaci* «250», на исход беременности кроликов

Table 1
Effect of experimental infection with *C. psittaci* "250" on pregnancy in rabbits

Номер животного	Группа	Исход беременности	Всего родилось крольчат	Пало крольчат		Выжило крольчат	
				количество	%	количество	%
1	Опытная	м/р	6	6	100	0	0
2		м/р	5	5	100	0	0
3		роды, м/р	6	2	33	4	67
4		м/р	5	5	100	0	0
Итого по группе			22	18	82	4	18
5	Контроль	роды	6	0	0	6	100

«м/р» – мертворождение (stillbirth).

Таблица 2
Уровень комплементсвязывающих антител в крови инфицированных кроликов

Table 2
Level of complement-fixing antibodies in blood of infected rabbits

Номер животного	Группа	Титр хламидийных антител			
		до заражения	7-е сут	14-е сут	30-е сут
1	Опытная	–	1:10	1:20	1:40
2		–	1:5	1:20	1:40
3		–	1:10	1:80	1:80
4		–	1:5	1:40	1:80
Средний титр по группе		–	1:7,5	1:40	1:60
5	Контроль	–	–	–	–

тологических родов были проведены исследования по реизоляции возбудителя из проб внутренних органов (печени) мертворожденных плодов с положительными результатами ПЦР на развивающихся 6-суточных

Таблица 3
Реизоляция *C. psittaci* «250» из клинических и патологических материалов от инфицированных крольчих после окрота

Table 3
Re-isolation of *C. psittaci* "250" from clinical and pathological material from infected rabbits after kindling

Номер животного	Группа	Материал для исследования	Результаты микроскопических исследований	Реизоляция хламидий на куриных эмбрионах	Результаты ПЦР-исследования
1	Опытная	соскоб со слизистой влагалища	–	не исследовался	–
		печень плода	+	+	+
2		соскоб со слизистой влагалища	–	не исследовался	–
		печень плода	+	+	+
3		соскоб со слизистой влагалища	–	не исследовался	–
		печень плода	+	+	+
4		соскоб со слизистой влагалища	–	не исследовался	–
		печень плода	+	+	+
5	Контроль	соскоб со слизистой влагалища	–	не исследовался	–
		печень плода	–	–	–

«–» – отрицательный результат исследования (negative test results);

«+» – положительный результат исследования (positive test results).

эмбрионах кур с последующей микроскопией мазков-отпечатков с целью обнаружения элементарных телец хламидий. Хламидии были выделены уже на первом пассаже. Специфическая гибель эмбрионов наступала на 4–8-е сут после заражения 20%-й суспензией патологических материалов. Кроме подтверждения хламидийной этиологии мертворождений у крольчих это свидетельствовало о высокой вирулентности реизолированных от кроликов изолятов хламидий. Введение патологических материалов из печени плодов контрольного кролика в желточный мешок развивающихся эмбрионов кур показало отрицательный результат.

Анализируя полученные в ходе эксперимента данные, можно прийти к выводу, что использование только ПЦР дает неполную картину при прижизненной диагностике хламидийной инфекции у животных. Целесообразным является применение ретроспективных методов, таких как РСК с хламидийным антигеном. Эта реакция позволяет выявлять специфические хламидийные антитела, рост титра которых в крови у животных может свидетельствовать об активной форме инфекционного процесса и служить основанием для постановки диагноза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований было установлено, что инфицирование сукольных крольчих вирулентной культурой штамма *Chlamydia psittaci* «250» вызывает развитие у них активного инфекционного процесса, в ходе течения которого были зафиксированы повышение температуры тела, появление респираторных симптомов и ухудшение общего состояния испытуемых животных. Помимо этого, у всех подопытных крольчих наблюдали патологический исход окролов. Из 22 полученных крольчат выжило только 4. Выживаемость приплода составила 18%. Прижизненно подтвердить хламидийную этиологию патологических процессов у инфицированных животных удалось только в ходе проведения серологических исследований (РСК). Микроскопия мазков-отпечатков и ПЦР-исследования соскобов из уrogenитального тракта больных животных дали отрицательные результаты. Однако хламидийная этиология патологических окролов кроликов была подтверждена при исследовании внутренних органов плодов, полученных от инфицированных животных, методом ПЦР и реизоляцией хламидий на 6-суточных куриных эмбрионах.

Таким образом, использование только ПЦР дает неполную картину при прижизненной диагностике хламидийной инфекции у животных. Следовательно, целесообразным является применение не только молекулярных, но и таких ретроспективных методов, как РСК с хламидийным антигеном, позволяющая выявлять специфические хламидийные антитела, рост титра которых в крови у животных может служить основанием для постановки диагноза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боровкова Л. В., Челнокова Е. В. Современные методы диагностики и лечения инфекций, передающихся половым путем. *Медицинский альманах*. 2010; 2 (11): 150–156. EDN: MBFQOB.
2. Герасимова В. М., Марченко В. С., Парфентьева Т. М., Истомина Д. Н. Сравнительная характеристика лабораторных методов диагностики хламидиоза. *Вестник Челябинского государственного университета. Образование и здравоохранение*. 2021; 4 (16): 47–52. DOI: 10.24411/2409-4102-2021-10407.

3. Руководство по лабораторной диагностике инфекций уrogenитального тракта. Под ред. М. Домейки, А. М. Савичевой, Е. В. Соколовского, Р. Балларда, М. Унемо. СПб.: Н-Л; 2012. 288 с.

4. Ульянова О. В., Салтыков Ю. В., Зайцев С. С., Хижнякова М. А., Филонова Н. Н., Субботина И. А. и др. Лабораторная диагностика хламидиоза. Методические рекомендации. СарНИВИ; ФГБНУ ФИЦВиМ; 2019. 29 с.

5. Harding-Esch E. M., Cousins E. C., Chow S. C., Phillips L. T., Hall C. L., Cooper N., et al. A 30-min nucleic acid amplification point-of-care test for genital *Chlamydia trachomatis* infection in women: a prospective, multi-center study of diagnostic accuracy. *EBioMedicine*. 2018; 28: 120–127. DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.12.029.

6. Widdice L. E., Hsieh Y. H., Silver B., Barnes M., Barnes P., Gaydos C. A. Performance of the Atlas genetics rapid test for *Chlamydia trachomatis* and women's attitudes toward point-of-care testing. *Sex. Transm. Dis.* 2018; 45 (11): 723–727. DOI: 10.1097/OLQ.0000000000000865.

7. Федорова В. А., Ляпина А. М., Хижнякова М. А., Зайцев С. С., Салтыков Ю. В., Субботина И. А. и др. Хламидиозы животных и человека. М.: Наука; 2019. 135 с. DOI: 10.7868/9785020402492.

8. Feodorova V. A., Zaitsev S. S., Khizhnyakova M. A., Saltykov Y. V., Evstifeev V. V., Khusainov F. M., et al. Data of *de novo* genome assembly of the *Chlamydia psittaci* strain isolated from the livestock in Volga Region, Russian Federation. *Data Brief*. 2020; 29:105190. DOI: 10.1016/j.dib.2020.105190.

9. Шилова Е. Н., Шкуратова И. А., Ряпосова М. В., Вялых И. В., Козлова Н. А. Эффективность специфических методов диагностики хламидиоза крупного рогатого скота. *Ветеринария*. 2014; 4: 21–24. EDN: RZUAIYX.

10. Stothard D. R., Boguslawski G., Jones R. B. Phylogenetic analysis of the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein and examination of potential pathogenic determinants. *Infect. Immun.* 1998; 66 (8): 3618–3625. DOI: 10.1128/IAI.66.8.3618-3625.1998.

11. Ripa T., Nilsson P. A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. *Euro Surveill*. 2006; 11 (11):E061109.2. DOI: 10.2807/esw.11.45.03076-en.

12. Федорова В. А., Полянина Т. И., Салтыков Ю. В., Зайцев С. С., Ласкавый В. Н., Ульянова О. В., Мотин В. Л. Обнаружение *Chlamydia trachomatis* у абортировавших овец. *Ветеринария*. 2016; 1: 22–26. EDN: VMFVFEV.

13. Федорова В. А., Салтыков Ю. В., Филонова Н. Н., Субботина И. А., Зайцев С. С., Ульянова О. В. и др. Детекция нового шведского варианта *Chlamydia trachomatis* у крупного рогатого скота. *Ветеринария*. 2019; 7: 27–31. DOI: 10.30896/0042-4846.2019.22.7.27-31.

14. Ripa T., Nilsson P. A. A *Chlamydia trachomatis* strain with a 377-bp deletion in the cryptic plasmid causing false-negative nucleic acid amplification tests. *Sex. Transm. Dis.* 2007; 34 (5): 255–256. DOI: 10.1097/OLQ.0b013e31805ce2b9.

15. Евстифеев В. В., Хусаинов Ф. М., Барбарова Л. А., Равилов А. З. Усовершенствование комплементарного антигена для диагностики хламидиоза животных. *Материалы Всероссийской научно-практической конференции по актуальным проблемам агропромышленного комплекса (29–30 октября 2004 г.)*. Казань: Казанская ГАВМ; 2004; 33–34. EDN: MYSJIL.

16. Unemo M., Olcén P., Agné-Stadling I., Feldt A., Jurstrand M., Herrmann B., et al. Experiences with the new genetic variant of *Chlamydia trachomatis* in Örebro county, Sweden – proportion, characteristics and effective diagnostic solution in an emergent situation. *Euro Surveill*. 2007; 12 (4):E5-6. DOI: 10.2807/esm.12.04.00699-en.

17. Herrmann B., Törner A., Low N., Klint M., Nilsson A., Velicko I., et al. Emergence and spread of *Chlamydia trachomatis* variant, Sweden. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14 (9): 1462–1465. DOI: 10.3201/eid1409.080153.

18. Feodorova V. A., Polyamina T. I., Konnova S. S., Laskavy V. N. First case of detection of *Chlamydia trachomatis* in livestock in Russia. In: *Proceeding of 5th Congress of European Microbiologists (21–25 July 2013, Germany)*. Leipzig: FEMS; 2013; 237.

19. Feodorova V. A., Zaitsev S. S., Saltykov Y. V., Sultanakhmedov E. S., Bakulev A. L., Ulyanov S. S., Motin V. L. An asymptomatic patient with fatal infertility carried a Swedish strain of *Chlamydia trachomatis* with additional deletion in the plasmid *orf1* that belonged to a different MLST sequence type. *Microorganisms*. 2019; 7 (7):187. DOI: 10.3390/microorganisms7070187.

20. Евстифеев В. В., Хусаинов Ф. М., Яковлев С. И., Хусаинова Г. И., Иванова С. В. Результаты клинических испытаний универсальной вакцины против хламидиоза сельскохозяйственных животных. *Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию Армавирской биофабрики (20–21 августа 2021 г.)*. М.: 2021; 244–251. DOI: 10.47804/978-5-89904-0290_2021_244.

REFERENCES

1. Borovkova L. V., Chelnokova E. V. The contemporary methods of diagnostics and treating of the sexually transmitted diseases. *Medical almanac*. 2010; 2 (11): 150–156. EDN: MBFQOB. (in Russ.)

2. Gerasimova V. M., Marchenko V. S., Parfentjeva T. M., Istomina D. N. Comparative characteristics of laboratory methods for the diagnosis of chlamydia. *Bulletin of Chelyabinsk State University. Education and Health-care*. 2021; 4 (16): 47–52. DOI: 10.24411/2409-4102-2021-10407. (in Russ.)
3. Guidance on laboratory diagnosis of urogenital infections. Ed. by M. Domeika, A. M. Savicheva, E. V. Sokolovskiy, R. Ballard, M. Unemo. Saint Petersburg: N-L; 2012. 288 p. (in Russ.)
4. Ulyanova O. V., Saltykov Y. V., Zaitsev S. S., Khizhnyakova M. A., Filonova N. N., Subbotina I. A., et al. Laboratory diagnosis of *Chlamydia*. Guidance. SarVI; FRCVM; 2019. 29 p. (in Russ.)
5. Harding-Esch E. M., Cousins E. C., Chow S. C., Phillips L. T., Hall C. L., Cooper N., et al. A 30-min nucleic acid amplification point-of-care test for genital *Chlamydia trachomatis* infection in women: a prospective, multi-center study of diagnostic accuracy. *EBioMedicine*. 2018; 28: 120–127. DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.12.029.
6. Widdice L. E., Hsieh Y. H., Silver B., Barnes M., Barnes P., Gaydos C. A. Performance of the Atlas genetics rapid test for *Chlamydia trachomatis* and women's attitudes toward point-of-care testing. *Sex. Transm. Dis.* 2018; 45 (11): 723–727. DOI: 10.1097/OLQ.0000000000000865.
7. Feodorova V. A., Lyapina A. M., Khizhnyakova M. A., Zaitsev S. S., Saltykov Y. V., Subbotina I. A., et al. *Chlamydia* of animals and humans. Moscow: Nauka; 2019. 135 p. (in Russ.)
8. Feodorova V. A., Zaitsev S. S., Khizhnyakova M. A., Saltykov Y. V., Evstifeev V. V., Khusainov F. M., et al. Data of *de novo* genome assembly of the *Chlamydia psittaci* strain isolated from the livestock in Volga Region, Russian Federation. *Data Brief*. 2020; 29:105190. DOI: 10.1016/j.dib.2020.105190.
9. Shilova E. N., Shkuratova I. A., Riaposova M. V., Vyalyh I. V., Kozlova N. A. Effectiveness specific methods of diagnostic chlamydia in cattle. *Veterinariya*. 2014; 4: 21–24. EDN: RZUAYX. (in Russ.)
10. Stothard D. R., Boguslawski G., Jones R. B. Phylogenetic analysis of the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein and examination of potential pathogenic determinants. *Infect. Immun.* 1998; 66 (8): 3618–3625. DOI: 10.1128/IAI.66.8.3618-3625.1998.
11. Ripa T., Nilsson P. A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. *Euro Surveill*. 2006; 11 (11):E061109.2. DOI: 10.2807/esw.11.45.03076-en.
12. Feodorova V. A., Polyanina T. I., Saltykov Yu. V., Zaitsev S. S., Laskavy V. N., Ulyanova O. V., Motin V. L. Detection of *Chlamydia trachomatis* in aborted ewes. *Veterinariya*. 2016; 1: 22–26. EDN: VMFVEV. (in Russ.)
13. Feodorova V. A., Saltykov Y. V., Filonova N. N., Subbotina I. A., Zaitsev S. S., Ulyanova O. V., et al. Detection of the novel Swedish variant of *Chlamydia trachomatis* in cattle. *Veterinariya*. 2019; 7: 27–31. DOI: 10.30896/0042-4846.2019.22.7.27-31. (in Russ.)
14. Ripa T., Nilsson P. A. A *Chlamydia trachomatis* strain with a 377-bp deletion in the cryptic plasmid causing false-negative nucleic acid amplification tests. *Sex. Transm. Dis.* 2007; 34 (5): 255–256. DOI: 10.1097/OLQ.0b013e31805ce2b9.
15. Evstifeev V. V., Khusainov F. M., Barbarova L. A., Ravilov A. Z. Usovshenstvovanie kompleksnykh vyzyvayushchego antigena dlya diagnostiki khlamidioza zhivotnykh = Improvement of complement-binding antigen for the diagnosis of animal *Chlamydia*. *Materialy Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii po aktual'nykh problemam agropromyshlennogo kompleksa (29–30 oktyabrya 2004 g.) = Proceedings of All-Russian Scientific and Practical Conference on topical problems of the agro-industrial complex (October 29–30, 2004)*. Kazan: Kazan SAVM; 2004; 33–34. EDN: MYSJIL. (in Russ.)
16. Unemo M., Olcén P., Agné-Stadling I., Feldt A., Jursstrand M., Herrmann B., et al. Experiences with the new genetic variant of *Chlamydia trachomatis* in Örebro county, Sweden – proportion, characteristics and effective diagnostic solution in an emergent situation. *Euro Surveill*. 2007; 12 (4):E5-6. DOI: 10.2807/esm.12.04.00699-en.
17. Herrmann B., Törner A., Low N., Klint M., Nilsson A., Velicko I., et al. Emergence and spread of *Chlamydia trachomatis* variant, Sweden. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14 (9): 1462–1465. DOI: 10.3201/eid1409.080153.
18. Feodorova V. A., Polyanina T. I., Konnova S. S., Laskavy V. N. First case of detection of *Chlamydia trachomatis* in livestock in Russia. In: *Proceeding of 5th Congress of European Microbiologists (21–25 July 2013, Germany)*. Leipzig: FEMS; 2013; 237.
19. Feodorova V. A., Zaitsev S. S., Saltykov Y. V., Sultanakhmedov E. S., Bakulev A. L., Ulyanov S. S., Motin V. L. An asymptomatic patient with fatal infertility carried a Swedish strain of *Chlamydia trachomatis* with additional deletion in the plasmid *orf1* that belonged to a different MLST sequence type. *Microorganisms*. 2019; 7 (7):187. DOI: 10.3390/microorganisms7070187.
20. Evstifeev V. V., Khusainov F. M., Yakovlev S. I., Khusainova G. I., Ivanova S. V. Results of clinical trials of a universal vaccine against *Chlamydia* in farm animals. *Nauchnye osnovy proizvodstva i obespecheniya kachestva biologicheskikh preparatov: materialy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi 100-letiyu Armavirskoi biofabriki (20–21 avgusta 2021 g.) = Scientific basis for production and quality assurance of biological preparations: proceedings of the international research-to-practice conference dedicated to the 100th anniversary of the Armavir Biofactory (20–21 August 2021)*. Moscow: 2021; 244–251. DOI: 10.47804/978-5-89904-0290_2021_244. (in Russ.)

Поступила в редакцию / Received 14.03.2023

Поступила после рецензирования / Revised 12.05.2023

Принята к публикации / Accepted 15.06.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Евстифеев Виталий Валерьевич, доктор биологических наук, доцент, главный научный сотрудник лаборатории вирусных антропоознозов животных ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-9882-3475>, e-mail: evstifeev@vniivi.ru.

Хусаинов Фидайль Миннигалеевич, доктор ветеринарных наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусных антропоознозов животных ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-3101-7740>, e-mail: fidail63@mail.ru.

Яковлев Сергей Игоревич, кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник лаборатории вирусных антропоознозов животных ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-4944-6559>, e-mail: arena176@rambler.ru.

Шангараев Рафкат Искандарович, кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетического анализа, ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-3689-1442>, e-mail: rafkat.shangaraev@mail.ru.

Еремec Владимир Иванович, доктор биологических наук, профессор, руководитель научного направления, главный научный сотрудник ФГБНУ ВНИТИБП, пос. Биокомбината, Московская обл., Россия; <https://orcid.org/0000-0001-9539-3756>, e-mail: vieremec2@yandex.ru.

Vitaliy V. Evstifeev, Doctor of Science (Biology), Associate Professor, Chief Researcher, Laboratory for Viral Anthropozoonoses of Animals, FSBSI "FCTRBS-ARRVI", Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-9882-3475>, e-mail: evstifeev@vniivi.ru.

Fidail M. Khusainov, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Leading Researcher, Laboratory for Viral Anthropozoonoses of Animals, FSBSI "FCTRBS-ARRVI", Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-3101-7740>, e-mail: fidail63@mail.ru.

Sergey I. Yakovlev, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Junior Researcher, Laboratory for Viral Anthropozoonoses of Animals, FSBSI "FCTRBS-ARRVI", Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-4944-6559>, e-mail: arena176@rambler.ru.

Rafkat I. Shangaraev, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Junior Researcher, Laboratory for Molecular and Genetic Analysis, FSBSI "FCTRBS-ARRVI", Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-3689-1442>, e-mail: rafkat.shangaraev@mail.ru.

Vladimir I. Eremets, Doctor of Science (Biology), Professor, Head of Scientific Direction, Chief Researcher, VNIITBP, pos. Biokombinata, Moscow Oblast, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-9539-3756>, e-mail: vieremec2@yandex.ru.



Метаболические особенности и микрофлора молока при маститах у коров Амурской области

М. Е. Остякова¹, И. С. Шульга¹, В. К. Ирхина¹, К. С. Косицына², Н. С. Голайдо¹

¹ ФГБНУ «Дальневосточный зональный научно-исследовательский ветеринарный институт» (ФГБНУ ДальЗНИВИ), г. Благовещенск, Россия

² ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный аграрный университет» (ФГБОУ ВО Дальневосточный ГАУ), г. Благовещенск, Россия

РЕЗЮМЕ

Эффективное ведение молочного скотоводства неразрывно связано с получением молока высокого санитарного качества, одной из причин снижения производства которого являются маститы. Цель работы заключалась в исследовании микробиологического профиля молока, определении чувствительности выделенных микроорганизмов к антибиотикам и изучении метаболических особенностей при маститах у коров Амурской области. В животноводческих хозяйствах Амурской области в пробах молока от больных маститом коров в 34,69% случаев выявляли *Staphylococcus epidermidis*; в 32,65 и 30,61% проб обнаруживали ассоциации микроорганизмов: *Streptococcus agalactiae* + *Escherichia coli* и *Staphylococcus saprophyticus* + *Streptococcus agalactiae* + *Escherichia coli* соответственно; доля *Staphylococcus haemolyticus* составила 2,05%. Выделенные из молока от больных маститом коров *Escherichia coli* были чувствительны к цефотаксиму (28,00 ± 2,00 мм) и цефтриаксону (27,50 ± 0,35 мм); *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus* – к цефотаксиму (35,50 ± 0,18 мм) и амоксицилину (35,1 ± 0,35 мм); *Streptococcus agalactiae* – к тетрациклину (27,60 ± 1,17 мм) и гентамицину (26,40 ± 0,99 мм). У больных маститом коров отмечали нарушения метаболизма. Был снижен альбумин-глобулиновый коэффициент (0,41), что характерно для воспалительных процессов различной локализации, а низкий уровень альбуминов (29,00 ± 0,89%) свидетельствовал о снижении протеинсинтетической функции гепатоцитов. Умеренное увеличение гамма-глобулинов (47,60 ± 1,05%) было связано с раздражением системы фагоцитирующих мононуклеаров. Нарушения водно-минерального обмена характеризовались низким уровнем кальция (1,80 ± 0,03 ммоль/л) и магния (0,70 ± 0,02 ммоль/л), что отмечается при многих патологических состояниях, а также при усиленной лактации. Соотношение кальция и фосфора было снижено (0,82). Гематологические показатели свидетельствовали о гипохромной анемии (уровень гемоглобина – 100,60 ± 1,28 г/л, цветового показателя – 0,60 ± 0,01). Лейкограмма указывала на лимфоцитопению (36,90 ± 2,60%) и нейтрофилию (палочкоядерных нейтрофилов – 1,80 ± 0,13%, сегментоядерных нейтрофилов – 51,80 ± 2,51%).

Ключевые слова: Амурская область, мастит, крупный рогатый скот, молочная железа, условно-патогенные микроорганизмы, микробиологическое исследование, антибиотики, гематологические исследования

Для цитирования: Остякова М. Е., Шульга И. С., Ирхина В. К., Косицына К. С., Голайдо Н. С. Метаболические особенности и микрофлора молока при маститах у коров Амурской области. *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (3): 228–232. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-228-232.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Остякова Марина Евгеньевна, доктор биологических наук, доцент, директор ФГБНУ ДальЗНИВИ, 675000, Россия, Амурская обл., г. Благовещенск, ул. Северная, 112, e-mail: dalznividv@mail.ru.

Metabolism features and milk microbiota of cows with mastitis in the Amur Oblast

М. Е. Ostyakova¹, I. S. Shulga¹, V. K. Irkhina¹, K. S. Kositsyna², N. S. Golaydo¹

¹ FSBSI Far East Zone Research Veterinary Institute (FSBSI FEZRVI), Blagoveshchensk, Russia

² FSBEI HE "Far Eastern State Agrarian University" (FSBEI HE Far Eastern SAU), Blagoveshchensk, Russia

SUMMARY

The effective management practices of dairy farming are inextricably linked with the production of high quality milk, while the mastitis is one of the causes of reductions in milk yields and quality. The aim of the work was to study the microbiological profile of milk, the sensitivity of isolated microorganisms to antibiotics and metabolism features of cows with mastitis in the Amur Oblast. The following microorganisms were identified in the milk samples from cows with mastitis: *Staphylococcus epidermidis* (34.69%); microbial associations: *Streptococcus agalactiae* + *Escherichia coli* (32.65%) and *Staphylococcus saprophyticus* + *Streptococcus agalactiae* + *Escherichia coli* (30.61%); *Staphylococcus haemolyticus* (2.05%). Microorganisms isolated from the milk of mastitis-affected cows were susceptible to the following antimicrobials: *Escherichia coli* to cefotaxime (28.00 ± 2.00 mm) and ceftriaxone (27.50 ± 0.35 mm); *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus* to cefotaxime (35.50 ± 0.18 mm) and amoxicillin (35.10 ± 0.35 mm); *Streptococcus agalactiae* to tetracycline (27.60 ± 1.17 mm) and gentamicin (26.40 ± 0.99 mm). Metabolic disorders were observed in cows with mastitis. The albumin-globulin ratio was reduced (0.41), which is typical for various inflammatory processes; and a low albumin levels (29.00 ± 0.89%) suggested a decreased protein synthesis in hepatocytes. A moderate increase in gamma globulins (47.60 ± 1.05%) was associated with stimulation of the phagocytic mononuclear system. Water and mineral metabolism disorders were confirmed by low levels of calcium (1.80 ± 0.03 mmol/L) and magnesium (0.70 ± 0.02 mmol/L), which is a sign of many pathological conditions, and is

associated with heavy lactation. Calcium-phosphorus ratio was reduced (0.82). Hematological indicators suggested hypochromic anemia (hemoglobin level – 100.60 ± 1.28 g/L, globular value – 0.60 ± 0.01). The leukogram was indicative of lymphocytopenia ($36.90 \pm 2.60\%$) and neutrophilia (rod-shaped neutrophils – $1.80 \pm 0.13\%$, segmented neutrophils – $51.80 \pm 2.51\%$).

Keywords: Amur Oblast, mastitis, cattle, mammary gland, opportunistic microorganisms, microbiological test, antibiotics, hematological tests

For citation: Ostyakova M. E., Shulga I. S., Irkhina V. K., Kositsyna K. S., Golaydo N. S. Metabolism features and milk microbiota of cows with mastitis in the Amur Oblast. *Veterinary Science Today*. 2023; 12 (3): 228–232. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-228-232.

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

For correspondence: Marina E. Ostyakova, Doctor of Science (Biology), Associate Professor, Director, FSBSI FEZRVI, 675000, Russia, Amur Oblast, Blagoveshchensk, ul. Severnaya, 112, e-mail: dalznividv@mail.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Эффективное ведение молочного скотоводства неразрывно связано с получением молока высокого санитарного качества, одной из причин снижения производства которого являются маститы [1–3]. Болезнь может развиваться во все периоды функционального состояния вымени коровы, однако наиболее часто – в период лактации (36%) и запуска (23%). Затем следуют сухостойный период (16%) и период сразу после отела (25%) [4].

Микрофлора в молочную железу может попадать разными путями: галактогенным (приоритетный), гематогенным и лимфогенным [5]. Реализация галактогенного пути инфицирования молочной железы микроорганизмами происходит у высокопродуктивных молочных коров при нарушении обмена веществ, снижении иммунитета.

Условия кормления и содержания способствуют бактериальной манифестации наиболее часто диагностируемых при маститах патогенных и условно-патогенных микроорганизмов: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* [1, 6–11].

Для терапии мастита у крупного рогатого скота применяются антибиотики разных поколений, но бесконтрольное их использование может привести к формированию устойчивости к ним микроорганизмов [1].

Анализ обмена веществ коров при маститах, гематологические исследования, бактериологический анализ молока и исследование чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам позволит правильно и своевременно определить тактику лечения коров.

Цель работы – изучить микробиологический профиль молока, чувствительность микроорганизмов к антибиотикам и метаболические особенности при маститах у коров Амурской области.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили в животноводческих хозяйствах Амурской области с привязной технологией содержания крупного рогатого скота. Исследовано 84 пробы молока от 21 коровы голштинизированной породы в период лактации, количество лактаций – 2–4.

Для исследований стерильно отбирали пробы альвеолярного молока из каждой четверти вымени. Предварительный диагноз на мастит и дифференциацию по видам мастита ставили с помощью экспресс-диагностикума «Масттест» (ООО НПП «Агрофарм», Россия).

Бактериологическое исследование проводили в соответствии с «Наставлением по диагностике, терапии и профилактике мастита у коров»¹, «Методическими указаниями по бактериологическому исследованию молока и секрета вымени коров»², ГОСТ 32901-2014 «Молоко и молочная продукция. Методы микробиологического анализа»³.

Для выделения и идентификации *E. coli* использовали среды Кесслера и Эндо. Из изолированных колоний делали мазки, окрашивали их по Граму. При обнаружении в мазках стафилококков выделенную культуру проверяли на каталазную активность (газообразование с перекисью водорода). Для выделения стрептококков из молока использовали плотную среду Карташовой, дифференцировали от стафилококков по отсутствию каталазной активности.

На плотных питательных средах диско-диффузионным методом с использованием бумажных дисков⁴ изучали чувствительность бактерий к следующим антибиотикам: ампициллину, амоксициллину, новобиоцину, неомоцину, бензилпенициллину, цефотаксиму, канамицину, цефтриаксону, доксициклину, полимиксину, гентамицину, тетрациклину.

Кровь отбирали из хвостовой вены и для гематологических исследований стабилизировали ее гепарином. Биохимические исследования сыворотки крови

¹ Наставление по диагностике, терапии и профилактике мастита у коров: утв. Министерством сельского хозяйства и продовольствия РФ 30.03.2000 № 13-5-2/1948. Режим доступа: <http://gost.gtsever.ru/Data2/1/4293732/4293732518.htm>.

² Методические указания по бактериологическому исследованию молока и секрета вымени коров: утв. ГУВ МСХ СССР 30.12.1983. № МУ 115-69. Режим доступа: https://standartgost.ru/g/MU_115-69.

³ ГОСТ 32901-2014 Молоко и молочная продукция. Методы микробиологического анализа. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200115745>.

⁴ Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: методические указания. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России; 2004. 91 с. Режим доступа: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293754/4293754463.pdf>.

проводили на фотометре StatFax 1904+R (Awareness Technology, Inc., США) с использованием набора реагентов производства АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн» (Россия). Гематологические исследования выполняли по общепринятым методикам.

Все манипуляции с животными выполняли в соответствии с Европейской конвенцией ETS № 123.

Статистическую обработку результатов осуществляли стандартными методами с использованием программного комплекса MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В 58,33% проб поверхностно-активное вещество «Масттеста» (сульфонол), взаимодействуя с ДНК ядер соматических клеток молока, образовывало сгусток различной плотности, что указывало на воспаление вымени. Взаимодействия смеси молока с диагностикумом отличались и давали следующие результаты: 36,90% – сомнительный; 5,95% (+), 15,48% (++) – положительный. В 41,67% проб реакция отсутствовала (отрицательный результат).

При исследовании вымени было выявлено, что чаще всего (28,57%) воспалительный процесс локализовался в задних долях вымени. На втором месте были поражения передних левых долей (24,49%), затем – передних правых (18,37%).

Наибольшее поражение (++) по результатам использования «Масттеста» диагностировалось в задних долях вымени: 57,14% – в левой и 35,71% – в правой.

Количество КОЕ/г в пораженных долях вымени $[(34,70 \pm 2,46) \times 10^5, n = 49]$ достоверно ($p < 0,001$) отличалось от количества КОЕ/г в непораженных долях вымени $[(15,40 \pm 0,86) \times 10^5, n = 35]$.

В пробах молока от больных маститом коров выявили: 1) *Staphylococcus epidermidis* (34,69%); 2) ассоциации микроорганизмов *Streptococcus agalactiae* + *Escherichia coli* (32,65%) и *Staphylococcus saprophyticus* + *Streptococcus agalactiae* + *Escherichia coli* (30,61%); 3) *Staphylococcus haemolyticus* (2,05%).

При изучении антибиотикорезистентности выделенных микроорганизмов самая высокая чувствительность была выявлена к следующим антибиотикам ($n = 24$): *Escherichia coli* – к цефотаксиму ($28,00 \pm 2,00$ мм, $p < 0,001$) и цефтриаксону ($27,50 \pm 0,35$ мм, $p < 0,001$); *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus* – к цефотаксиму ($35,50 \pm 0,18$ мм, $p < 0,001$) и амоксициллину ($35,10 \pm 0,35$ мм, $p < 0,001$); *Streptococcus agalactiae* – к тетрациклину ($27,60 \pm 1,17$ мм, $p < 0,001$) и гентамицину ($26,40 \pm 0,99$ мм, $p < 0,001$).

Биохимический анализ крови показал повышение уровней общего белка ($94,70 \pm 0,75$ г/л, $p < 0,001$) и гамма-глобулинов ($47,60 \pm 1,05\%$, $p < 0,001$); снижение количества альбуминов ($29,00 \pm 0,89\%$, $p < 0,001$) и альфа-глобулинов ($10,60 \pm 0,72\%$, $p < 0,001$). Уровни бета-глобулинов ($12,80 \pm 0,69\%$), мочевины ($4,40 \pm 0,10$ ммоль/л) и креатинина ($67,10 \pm 0,87$ мкмоль/л) были в пределах физиологической нормы. Альбумин-глобулиновый коэффициент был снижен до 0,41 (норма 1,2–1,8).

Уровень билирубина ($8,50 \pm 0,44$ мкмоль/л, $p < 0,001$) превышал нормативные значения, активность аминотрансфераз (АЛТ и АСТ соответственно $21,50 \pm 0,61$ и $97,40 \pm 8,48$ ЕД/л) была в пределах физиологической нормы, а концентрация глюкозы в крови ($1,00 \pm 0,02$ ммоль/л, $p < 0,001$) – низкой.

При исследовании водно-электролитного обмена установили, что на фоне нормативных значений фосфора ($2,20 \pm 0,04$ ммоль/л) и калия ($4,50 \pm 0,06$ ммоль/л) уровни кальция ($1,80 \pm 0,03$ ммоль/л, $p < 0,001$) и магния ($0,70 \pm 0,02$ ммоль/л, $p < 0,001$) были понижены. Соотношение кальция и фосфора равнялось 0,82.

Гематологические исследования выявили повышенное содержание эритроцитов $[(8,80 \pm 0,14) \times 10^{12}/л, p < 0,001]$, низкие уровни гемоглобина ($100,60 \pm 1,28$ г/л, $p < 0,001$) и цветового показателя ($0,60 \pm 0,01$, $p < 0,001$), что указывало на анемию. Лейкоциты $[(7,70 \pm 0,40) \times 10^9/л, p < 0,001]$ были в пределах физиологической нормы, но лейкограмма показала снижение количества лимфоцитов ($36,90 \pm 2,60\%$, $p < 0,001$) и палочкоядерных нейтрофилов ($1,80 \pm 0,13\%$, $p < 0,001$), а также увеличение количества сегментоядерных нейтрофилов ($51,80 \pm 2,51\%$, $p < 0,001$).

В результате проведенных исследований установлено, что при маститах у коров в молоке обнаруживаются следующие микроорганизмы: *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae* и *Escherichia coli*, что согласуется с данными других исследователей [12–16].

Молоко больных маститом коров содержало как одного представителя условно-патогенной микрофлоры (*Staphylococcus epidermidis* – 34,69% и *Staphylococcus haemolyticus* – 2,05%), так и ассоциации микроорганизмов (*Streptococcus agalactiae* + *Escherichia coli* – 32,65% и *Staphylococcus saprophyticus* + *Streptococcus agalactiae* + *Escherichia coli* – 30,61%).

Выделенные стафилококки и стрептококки, в зависимости от вида секретируемых в процессе своей жизнедеятельности токсинов, повреждают мембраны эритроцитов, лейкоцитов, гепатоцитов, кардиомиоцитов, клеток соединительной ткани; подавляют фагоцитоз и растворяют фибрин демаркационного вала при воспалении; нарушают осмотическое давление и приводят к лизису клеток; отдельно и совместно с энтеробактериями способны вызывать экзогенные инфекции [17].

При изучении чувствительности выделенных из молока больных маститом коров микроорганизмов было определено, что наибольший диаметр зон подавления роста у энтеробактерий и стафилококков был к цефотаксиму, а стрептококки были чувствительны к тетрациклину и гентамицину. Поэтому при воспалении молочной железы, обусловленном ассоциациями микроорганизмов, необходимо применять несколько антибактериальных препаратов.

Анализ белкового обмена у больных маститом коров показал снижение альбумин-глобулинового коэффициента (0,41), что характерно для воспалительных процессов различной локализации, а низкий уровень альбуминов ($29,00 \pm 0,89\%$) свидетельствовал о снижении протеинсинтетической функции гепатоцитов. Умеренное увеличение гамма-глобулинов ($47,60 \pm 1,05\%$) было связано с раздражением системы фагоцитирующих мононуклеаров [18].

Нарушения водно-минерального обмена характеризовались низким уровнем кальция и магния, что отмечается при многих патологических состояниях, а также при усиленной лактации. Соотношение кальция и фосфора, равное 0,82, характерно для коров в период сухостоя. Для лактирующих коров данное значение должно быть 1,2–1,8 [18].

Клинический анализ крови показал у животных гипохромную анемию, лимфоцитопению и нейтрофилез, что характерно для воспалительного процесса при инфекции [19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В животноводческих хозяйствах Амурской области в пробах молока от больных маститом коров в 34,69% случаев выявляли *Staphylococcus epidermidis*; 32,65 и 30,61% составляли ассоциации микроорганизмов: *Streptococcus agalactiae* + *Escherichia coli* и *Staphylococcus saprophyticus* + *Streptococcus agalactiae* + *Escherichia coli* соответственно; *Staphylococcus haemolyticus* обнаруживали в 2,05% проб.

Выделенные из молока от больных маститом коров *Escherichia coli* были чувствительны к цефотаксиму и цефтриаксону; *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus* – к цефотаксиму и амоксициллину; *Streptococcus agalactiae* – к тетрациклину и гентамицину.

У больных маститом коров отмечали нарушения метаболизма. Был снижен альбумин-глобулиновый коэффициент, что указывает на развитие воспалительных процессов различной локализации, а низкий уровень альбуминов свидетельствовал о нарушении протеинсинтетической функции гепатоцитов. Умеренное увеличение гамма-глобулинов было связано с раздражением системы фагоцитирующих мононуклеаров. Нарушения водно-минерального обмена характеризовались низким уровнем кальция и магния, что отмечается при многих патологических состояниях, а также при усиленной лактации. Соотношение кальция и фосфора было снижено.

Гематологические показатели свидетельствовали о гипохромной анемии, а лейкограмма указывала на лимфоцитопению и нейтрофилию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Артемьева О. А., Никанова Д. А., Котковская Е. Н., Гладырь Е. А., Дозев А. В., Зиновьева Н. А. Антибиотикорезистентность штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных из молока высокопродуктивных коров. *Сельскохозяйственная биология*. 2016; 51 (6): 867–874. DOI: 10.15389/agrobiology.2016.6.867rus.
2. Сычева Т. С., Дрозд М. Н., Усевич В. М. Влияние кормовой минеральной добавки на профилактику мастита у коров. *Молодежь и наука*. 2017; 6: 119. EDN: YMGVEJ.
3. Грязнева Т. Н., Карabanov С. Ю., Решетникова Д. Г., Сидоренкова М. С., Богданова А. А. Эффективность лечебно-профилактических мероприятий при оздоровлении скотоводческого хозяйства от бактериальных инфекций без применения антибиотиков. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. 2021; 1 (87): 192–196. DOI: 10.37670/2073-0853-2021-87-1-192-196.
4. Илькив Н. Мастит коров: проблема, которой можно управлять. *Эффективное животноводство*. 2022; 3 (178): 84–89. EDN: GKZWB.
5. Клетикова Л. В., Маннова М. С., Якименко Н. Н. Метаболические изменения у коров при мастите и их динамика на фоне сорбционной терапии. *Вестник КрасГАУ*. 2021; (7): 135–142. DOI: 10.36718/1819-4036-2021-7-135-142.
6. Костерин Д. Ю., Иванов О. В., Петрова Ю. Ф., Алигаджиев М. Г., Мельникова Л. Э. Изучение микрофлоры молока коров при разных формах мастита. *Вестник АПК Верхневолжья*. 2020; 4 (52): 40–43. DOI: 10.35694/YARCX.2020.52.4.008.
7. Гордеева И. В., Ботникова Н. М., Кузнецов А. В., Кузминых А. А., Тебекин А. Б. Микрофлора молока при остром течении мастита у коров. *Ветеринарная патология*. 2006; (1): 21–25. EDN: NZATRP.
8. Искандарова С. С., Федоров А. И., Искандаров М. И., Ездакова И. Ю., Альбертян М. П. Новое направление в борьбе с маститами дойных животных. *Ветеринария и кормление*. 2018; 4: 15–18. DOI: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-4-5.
9. Скогорева А. М., Манжурина О. А., Попова О. В. Инфекционные болезни: к вопросу лечения субклинического мастита у коров.

Ветеринарно-санитарные аспекты качества и безопасности сельскохозяйственной продукции: материалы IV Международной научно-практической конференции (20 декабря 2019 г.). Воронеж: ФГБОУ ВО Воронежский ГАУ; 2020; 189–191. EDN: LRJDOP.

10. Горбатов А. В., Соколова Н. А., Лощинин М. Н. Факторы вирулентности стрептококков и стафилококков и специфическая профилактика маститов у коров. *Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии»*. 2019; 4 (32): 428–433. DOI: 10.25725/vet.san.hyg.ecol.201904014.
11. Семина Л. К., Авдеевская Н. Н., Скулябина З. А., Ворошилова Т. Г., Балдичева Г. А. Индикация кокковой микрофлоры в секрете вымени больных маститом коров. *Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии»*. 2018; 3 (27): 56–60. DOI: 10.25725/vet.san.hyg.ecol.201803010.
12. Исакова М. Н., Сивкова У. В., Ряпосова М. В., Шкуратова И. А., Лысов А. В. Показатели качества молока высокопродуктивных коров на фоне применения противомаститной вакцины. *Ветеринария сегодня*. 2020; (4): 255–260. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-255-260.
13. Джавадов Э. Д., Стекольников А. А., Ладанова М. А., Новикова О. Б. Микрофлора, выделяемая при мастите, и определение ее чувствительности к антибактериальным препаратам. *Международный вестник ветеринарии*. 2021; 1: 13–17. DOI: 10.17238/issn2072-2419.2021.1.13.
14. Филатова А. В., Тшивале Б. М., Федотов С. В., Авдеенко В. С., Климов Н. Т. Инфекционный фактор в этиологии мастита у высокопродуктивных лактирующих коров. *Ученые записки УО ВГАВМ*. 2022; 58 (4): 86–91. DOI: 10.52368/2078-0109-2022-58-4-86-91.
15. Руденко П. А., Руденко А. А., Ватников Ю. А. Микробный пейзаж при маститах у коров. *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии*. 2020; 2 (50): 172–179. DOI: 10.18286/1816-4501-2020-2-172-179.
16. Шевченко А. А., Литвинова А. Р., Черных О. Ю., Украина Е. Р. Распространение бактериальных инфекций крупного рогатого скота в Краснодарском крае и их профилактика. *Труды Кубанского государственного аграрного университета*. 2018; 70; 136–141. DOI: 10.21515/1999-1703-70-136-141.
17. Борисов Л. Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология: учебник. 4-е изд., доп. и перераб. М.: Медицинское информационное агентство; 2005. 736 с.
18. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: справочник. Под ред. И. П. Кондрахина. М.: КолосС; 2004. 520 с.
19. Камышников В. С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: справочник. В 2 т. Т. 1. 2-е изд. Мн.: Интерпрессервис; 2003. 495 с.

REFERENCES

1. Artem'eva O. A., Nikanova D. A., Kotkovskaya E. N., Gladyr' E. A., Dotsev N. A., Zinovieva A. V. Antibiotic-resistance profile of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of high yield cows in Central Russia. *Agricultural Biology*. 2016; 51 (6): 867–874. DOI: 10.15389/agrobiology.2016.6.867eng.
2. Sycheva T. S., Drozd M. N., Usevich V. M. The influence polymineral feed additive on the prevention of mastitis in cows. *Molodezh' i nauka*. 2017; 6: 119. EDN: YMGVEJ. (in Russ.)
3. Gryazneva T. N., Karabanov S. Y., Reshetnikova D. G., Sidorenkova M. S., Bogdanova A. A. Effectiveness of therapeutic and preventive measures when improving the health of livestock farms from bacterial infections without the use of antibiotics. *Izvestia Orenburg State Agrarian University*. 2021; 1 (87): 192–196. DOI: 10.37670/2073-0853-2021-87-1-192-196. (in Russ.)
4. Il'kin N. Mastit korov: problema, kotoroi mozhno upravlyat' = Mastitis in cows: a problem that can be managed. *Effektivnoe zhivotnovodstvo*. 2022; 3 (178): 84–89. EDN: GKZWB. (in Russ.)
5. Kletikova L. V., Mannova M. S., Yakimenko N. N. Metabolic changes in cows during mastitis and their dynamics in sorption therapy background. *Bulletin of KrasSAU*. 2021; (7): 135–142. DOI: 10.36718/1819-4036-2021-7-135-142. (in Russ.)
6. Kosterin D. Yu., Ivanov O. V., Petrova Yu. F., Aligadzhiev M. G., Melnikova L. E. The research of cow milk microflora in different forms of mastitis. *Herald of Agroindustrial Complex of Upper Volga Region*. 2020; 4 (52): 40–43. DOI: 10.35694/YARCX.2020.52.4.008. (in Russ.)
7. Gordeeva I. V., Botnikova N. M., Kuznetsov A. V., Kuzminykh A. A., Tebekin A. B. Mikroflora moloka pri ostrom techenii mastita u korov = Milk microbiota of cows with acute mastitis. *Veterinary Pathology*. 2006; (1): 21–25. EDN: NZATRP. (in Russ.)
8. Iskandarova S. S., Fedorov A. I., Iskandarov M. I., Ezdakova I. Y., Albertyan M. P. A new direction of scientific research in treatment of mastitis in milk animals. *Veterinaria i kormlenie*. 2018; 4: 15–18. DOI: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-4-5. (in Russ.)
9. Skogoreva A. M., Manzhurina O. A., Popova O. V. Epizootology and infectious diseases: on the treatment of subclinical mastitis in cows.

Veterinarno-sanitarnye aspekty kachestva i bezopasnosti sel'skokhozyaistvennoi produktsii: materialy IV Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (20 dekabrya 2019 g.) = Veterinary and sanitary aspects of agricultural product quality and safety: Proceedings of the IV International Scientific and Practical Conference (December 20, 2019). Voronezh: Voronezh SAU; 2020; 189–191. EDN: LRJDOP. (in Russ.)

10. Gorbатов A. V., Sokolova N. A., Loschinin M. N. Virulence factors of streptococci and staphylococci and specific prevention of mastitis of cows. *Russian Journal "Problems of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology"*. 2019; 4 (32): 428–433. DOI: 10.25725/vet.san.hyg.ecol.201904014. (in Russ.)

11. Semina L. K., Avduevskaya N. N., Skulyabina Z. A., Voroshilova T. G., Baldysheva G. A. Indication of coccal microflora of the udder secretion of cows with mastitis. *Russian Journal "Problems of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology"*. 2018; 3 (27): 56–60. DOI: 10.25725/vet.san.hyg.ecol.201803010. (in Russ.)

12. Isakova M. N., Sivkova U. V., Ryapsova M. V., Shkuratova I. A., Lysov A. V. Quality profile of milk from high producing dairy cows vaccinated against mastitis. *Veterinary Science Today*. 2020; (4): 255–260. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-255-260.

13. Djavadov E. D., Stekolnikov A. A., Ladanova M. A., Novikova O. B. Microflora released in mastitis and determination of its sensitivity to antibacterial drugs. *International Bulletin of Veterinary Medicine*. 2021; 1: 13–17. DOI: 10.17238/issn2072-2419.2021.1.13. (in Russ.)

14. Filatova A. V., Tshivale B. M., Fedotov S. V., Avdeenko V. S., Klimov N. T. Infectious factor in the etiology of mastitis in highly productive lactating cows. *Transactions of the Educational Establishment "Vitebsk the Order of the Badge of Honor" State Academy of Veterinary Medicine"*. 2022; 58 (4): 86–91. DOI: 10.52368/2078-0109-2022-58-4-86-91. (in Russ.)

15. Rudenko P. A., Rudenko A. A., Vatnikov Y. A. Microbial landscape in cows mastitis. *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy*. 2020; 2 (50): 172–179. DOI: 10.18286/1816-4501-2020-2-172-179. (in Russ.)

16. Shevchenko A. A., Litvinova A. R., Chernykh O. Yu., Ukraina E. R. Dissemination of bacterial infections of large horned cattle in the Krasnodar Region and their prophylaxis. *Proceedings of the Kuban State Agrarian University*. 2018; 70: 136–141. DOI: 10.21515/1999-1703-70-136-141. (in Russ.)

17. Borisov L. B. Medical microbiology, virology, immunology: training manual. 4th ed. supplemented and revised. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentsvo; 2005. 736 p. (in Russ.)

18. Methods of veterinary clinical laboratory diagnostics: guidebook. Ed. by I. P. Kondrakhin. Moscow: KolosS; 2004. 520 p. (in Russ.)

19. Kamyshnikov V. S. Clinical and biochemical laboratory diagnostics: guidebook. 2 volumes. Vol. 1. 2nd ed. Minsk: Interpresservis; 2003. 495 p. (in Russ.)

Поступила в редакцию / Received 06.06.2023

Поступила после рецензирования / Revised 05.07.2023

Принята к публикации / Accepted 11.08.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Остякова Марина Евгеньевна, доктор биологических наук, доцент, директор ФГБНУ ДальЗНИВИ, г. Благовещенск, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-2996-0991>, e-mail: dalznividv@mail.ru.

Шульга Ирина Станиславовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ФГБНУ ДальЗНИВИ, г. Благовещенск, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-2514-3879>, e-mail: dalznividv@mail.ru.

Ирхина Вера Константиновна, научный сотрудник ФГБНУ ДальЗНИВИ, г. Благовещенск, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-4553-7189>, e-mail: dalznividv@mail.ru.

Косицына Ксения Сергеевна, аспирант ФГБОУ ВО Дальневосточный ГАУ, г. Благовещенск, Россия; <https://orcid.org/0009-0005-6247-0280>, e-mail: kseniya-kos1997@yandex.ru.

Голайдо Наталья Сергеевна, научный сотрудник ФГБНУ ДальЗНИВИ, г. Благовещенск, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-1439-5125>, e-mail: dalznividv@mail.ru.

Marina E. Ostyakova, Doctor of Science (Biology), Associate Professor, Director, FSBSI FEZRVI, Blagoveshchensk, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-2996-0991>, e-mail: dalznividv@mail.ru.

Irina S. Shulga, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, FSBSI FEZRVI, Blagoveshchensk, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-2514-3879>, e-mail: dalznividv@mail.ru.

Vera K. Irkhina, Researcher, FSBSI FEZRVI, Blagoveshchensk, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-4553-7189>, e-mail: dalznividv@mail.ru.

Ksenia S. Kositsyna, Postgraduate Student, FSBEI HE Far Eastern SAU, Blagoveshchensk, Russia; <https://orcid.org/0009-0005-6247-0280>, e-mail: kseniya-kos1997@yandex.ru.

Natalya S. Golaydo, Researcher, FSBSI FEZRVI, Blagoveshchensk, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-1439-5125>, e-mail: dalznividv@mail.ru.



Эпизоотическая обстановка по инфекционному ринотрахеиту крупного рогатого скота в Карагандинской области Республики Казахстан в 2021–2022 гг.

В. В. Кирпиченко, Ф. А. Бакиева, С. Б. Маманова, Е. К. Оспанов, С. Е. Каймолдина

ТОО «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт» (ТОО «КазНИВИ»), г. Алматы, Республика Казахстан

РЕЗЮМЕ

В настоящее время в Республике Казахстан проводится полноценный серологический мониторинг на предмет обнаружения циркуляции возбудителя инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. Для проведения полноценного и показательного исследования соблюдались принципы обеспечения репрезентативности и математического расчета выборки. При формировании выборки среди общего количества эпизоотологических единиц большее внимание уделялось районам и населенным пунктам, в которых (или вблизи которых) ранее регистрировали случаи инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. Выборка среди поголовья, вошедшего в область исследования, осуществлялась в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения животных. Таким образом, в область исследования в 2021 и 2022 гг. вошли 7 районов Карагандинской области из 13 возможных. Оставшиеся 6 районов и городов областного значения будут исследованы в 2023 г. В статье представлены результаты ретроспективного анализа по инфекционному ринотрахеиту крупного рогатого скота и собственных исследований, выполненных в 2021–2022 гг. С помощью программ Statistica, Excel, QGIS проведена статистическая и графическая обработка результатов исследования. При изучении эпизоотической обстановки установили, что Карагандинская область в 2021–2022 гг. была неблагоприятна по заболеванию. Представленные Комитетом ветеринарного контроля и надзора Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан данные и результаты серологических исследований подтверждают факт циркуляции возбудителя инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в следующих районах Карагандинской области: Абайском, Актогайском, Бухар-Жырауском, Каркаралинском, Нурынском и Осакаровском.

Ключевые слова: эпизоотологический мониторинг, инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота, эпизоотическая ситуация, очаги инфекции

Благодарности: Исследование выполнено в рамках программно-целевого финансирования научных исследований Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан на 2021–2023 годы.

Для цитирования: Кирпиченко В. В., Бакиева Ф. А., Маманова С. Б., Оспанов Е. К., Каймолдина С. Е. Эпизоотическая обстановка по инфекционному ринотрахеиту крупного рогатого скота в Карагандинской области Республики Казахстан в 2021–2022 гг. *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (3): 233–239. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-233-239.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Кирпиченко Владимир Владимирович, кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией вирусологии ТОО «КазНИВИ», А20С2Е4 (050016), Республика Казахстан, г. Алматы, проспект Райымбека, 223, e-mail: vlad_92reik@mail.ru.

Epizootic situation for infectious bovine rhinotracheitis in the Karaganda Oblast, the Republic of Kazakhstan, in 2021–2022

V. V. Kirpichenko, F. A. Bakieva, S. B. Mamanova, E. K. Ospanov, S. E. Kaimoldina

LLP "Kazakh Scientific Research Veterinary Institute" (LLP "KazNIVI"), Almaty, Republic of Kazakhstan

SUMMARY

A comprehensive serological monitoring is currently underway in the Republic of Kazakhstan to detect the circulation of the infectious bovine rhinotracheitis pathogen. To conduct a full-fledged and resultful study, the principles of sampling size representativeness provision and mathematical calculations were observed. The sampling size of the total number of epizootological units included mainly the raions and settlements in which (or near which) infectious bovine rhinotracheitis cases had been previously recorded. The sampling size of livestock population included in the study was determined in accordance with the recommendations of the World Organization for Animal Health. Thus, the study covered 7 (out of 13) raions of the Karaganda Oblast in 2021 and 2022. The other 6 raions and cities of regional significance will be included in the research in 2023. The paper presents the results of infectious bovine rhinotracheitis retrospective analysis and own studies conducted in 2021–2022. Statistical analysis and graphical visualization of investigation results were performed using Statistica, Excel, and QGIS programs. It was established that the epizootic situation for this disease was unfavourable in the Karaganda Oblast in 2021–2022. The data and results of serological studies presented by the Veterinary Control and Surveillance Committee of the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan confirm the circulation of the infectious bovine rhinotracheitis virus in the following raions of the Karaganda Oblast: Abay, Aktogay, Bukhar-Zhyrau, Karkaraly, Nura and Osakarov.

Keywords: epizootological monitoring, infectious bovine rhinotracheitis, epizootic situation, infection outbreaks

Acknowledgements: The study was carried out within the scientific research program funded by the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan for 2021–2023.

For citation: Kirpichenko V. V., Bakieva F. A., Mamanova S. B., Ospanov E. K., Kaimoldina S. E. Epizootic situation for infectious bovine rhinotracheitis in the Karaganda Oblast, the Republic of Kazakhstan, in 2021–2022. *Veterinary Science Today*. 2023; 12 (3): 233–239. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-233-239.

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

For correspondence: Vladimir V. Kirpichenko, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of the Virology Laboratory, LLP "KazNIVI", A20C2E4 (050016), Republic of Kazakhstan, Almaty, Raiymbek av., 223, e-mail: vlad_92reik@mail.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота (ИРТ КРС) – это контагиозная болезнь, протекающая в виде персистентной инфекции и характеризующаяся поражениями органов респираторного тракта и репродуктивной системы животных. Одним из наиболее отличительных признаков этого заболевания считается гиперемия слизистых носового зеркала и перегородок, так называемый красный нос. Подобное характерное проявление ИРТ КРС отмечают в большинстве случаев у молодняка до года [1].

Возбудитель заболевания – ДНК-геномный альфагерпесвирус КРС 1-го типа из семейства *Orthoherpesviridae*. На сегодняшний день точно установлен факт существования двух подтипов вируса: 1.1 и 1.2. Первый – поражает органы дыхания, редко – репродуктивные органы, второй – вызывает генитальную форму заболевания. К настоящему времени доказано существование еще одного подтипа альфагерпесвируса КРС, однако некоторые его особенности дают основание для отнесения возбудителя к другому типу [2]. Как и большинство респираторных патогенов, вирус ИРТ КРС выделяется во внешнюю среду в основном через органы дыхательной системы [3].

Возбудитель ИРТ КРС довольно устойчив к условиям внешней среды. При 22 °С сохраняет вирулентность в течение 45 сут, при 4 °С – до 7 мес. Глубокое замораживание не влияет на активность вируса, показатели инфекционного титра стабильны в течение 7–9 мес. При нагревании выше 56 °С погибает в течение 7–20 мин. Вирус инактивируется при обработке хлорной известью, 2%-м раствором формалина или гидроксида натрия [2, 4].

Болезнь может протекать в различных формах: респираторной (с поражением верхних дыхательных путей) и генитальной (с поражением наружных половых органов). Кроме того, при ИРТ КРС отмечаются аборт, конъюнктивиты. У инфицированных в поздние сроки стельности *in utero* или в первые дни жизни часто наблюдается генерализованная инфекция [5, 6].

Источниками распространения инфекции являются больные животные и скрытые вирусоносители. Наибольшую опасность при инфекционном ринотрахеите, помимо бессимптомных носителей, представляют быки-производители, поскольку возбудитель способен к передаче от животного к животному через семя [1, 7–10].

Многими исследователями отмечена возможность одновременного присутствия в организме животных антител к вирусу ИРТ КРС и самого возбудителя инфек-

ции. Так, у животных с высоким уровнем титра антител удавалось выделить вирус из миндалин и лимфоузлов [1, 11–13].

Методы лечения при ИРТ КРС ограничиваются применением средств симптоматической терапии, отделением больных особей от здоровых и использованием специфической сыворотки против данного заболевания.

Одним из методов борьбы с ИРТ КРС является вакцинация [14, 15], которая считается наиболее эффективным способом профилактики заболевания. В настоящее время предпринимаются попытки использования субъединичных, рекомбинантных или сплит-вакцин для снижения распространения или искоренения ИРТ КРС в различных странах [8, 16–23]. В Российской Федерации наряду с импортными препаратами применяются инактивированные сорбированные вакцины фирмы ООО «НПО Нарвак», а также сорбированные и эмульсионные вакцины производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» (Россия). В странах Европы наиболее популярными считаются живые вакцины, такие как Bovi-shield Gold FP5 L5, INFORCE 3® (Zoetis Inc., США) и др. [24, 25].

Эпизоотологическая обстановка по ИРТ КРС в Республике Казахстан остается напряженной. Многие области страны охвачены инфекцией. Средний уровень серопревалентности среди невакцинированных животных колеблется от 65 до 87%, что наглядно демонстрирует циркуляцию возбудителя среди поголовья КРС в республике.

Инфекционный ринотрахеит в стране официально внесен в список особо опасных заболеваний КРС наряду с такими заболеваниями, как ящур, заразный узелковый дерматит и сибирская язва. Экономический ущерб, наносимый заболеванием, складывается из выбраковки животных, потери продуктивности и вынужденного убоя [26–30]. В настоящее время в Республике Казахстан не проводится полноценный эпизоотологический мониторинг ИРТ КРС. Лабораторная диагностика осуществляется лишь в местах, где ранее отмечались очаги заболевания. При этом среди поголовья отбираются всего по 5–10 проб для исследования, что является непоказательным ввиду малой выборки. Исходя из вышеперечисленного изучение данной болезни и проведение мониторинговых исследований на ИРТ КРС является актуальной задачей. Обоснование выборки среди эпизоотологических единиц и восприимчивого поголовья позволит визуализировать достоверную картину по заболеванию и даст возможность эффективно применять

существующие меры эпизоотологического контроля и планировать новые.

Целью данной работы были ретроспективный анализ и оценка текущей (2021–2022 гг.) эпизоотической ситуации по ИРТ КРС на территории Карагандинской области на основании сформированной выборки эпизоотологических единиц и целевых животных в них.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для определения эпизоотического статуса Карагандинской области по ИРТ КРС необходимо было собрать и обобщить имеющиеся на сегодняшний день эпизоотологические данные, оценить меры, применяемые при вспышках заболевания, а также выделить наиболее слабые аспекты комплекса ветеринарных мероприятий, которые нацелены на недопущение заноса и распространения возбудителя на территории страны. С этой целью в Комитет ветеринарного контроля и надзора Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан (КВКН МСХ РК) были направлены запросы на предоставление информации по отмеченным в 2021–2022 гг. случаям регистрации ИРТ КРС.

Для оценки текущей ситуации по ИРТ КРС на территории Карагандинской области была сформирована выборка среди эпизоотологических единиц, а также среди восприимчивого поголовья. С целью обеспечения достоверности выборки использовали рекомендации Всемирной организации здравоохранения животных (ВОЗЖ) и «Руководство для формирования эпизоотологической единицы (ЭЕ) и выборки из общего их наличия на административной территории для обследования и установления из них количества особей, необходимых для проведения последующих исследований, с целью определения эпизоотологического статуса стад, хозяйствующих субъектов и зооареалов», разработанное и утвержденное в ТОО «КазНИВИ» на основе положений и рекомендаций ВОЗЖ.

Для проведения исследования был выбран такой серологический метод, как иммуноферментный анализ (ИФА), являющийся одним из первостепенных при диагностике ИРТ КРС. Кроме того, согласно рекомендациям ВОЗЖ, метод ИФА определен как наиболее приемлемый для доказательства отсутствия или наличия циркуляции возбудителя в совокупности всей популяции¹.

Другими факторами при выборе метода диагностики послужили относительная дешевизна и скорость постановки в сравнении с полимеразной цепной реакцией, стоимость проведения которой в 1,5–2 раза выше, чем ИФА, а также выделением и дифференциацией возбудителя в культуре клеток, которые занимают много времени.

Для проведения исследований был использован коммерческий набор для обнаружения антител к вирусу инфекционного ринотрахеита КРС IDEXX IBR gB X3 Ab Test (infectious bovine rhinotracheitis) производства IDEXX Laboratories, Inc. (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор для исследования такой административной единицы Республики Казахстан, как Карагандинская

область, обусловлен стационарным неблагополучием региона.

В период с 2010 по 2012 г. территория Карагандинской области была благополучна по ИРТ КРС. При плановом мониторинговом исследовании циркуляции возбудителя выявить не удалось. Однако уже в 2013 г. на территории хозяйствующих субъектов Кызыларайского (Актогайский район) и Жараспайского (Нурунский район) сельских округов были зарегистрированы случаи подозрения на ИРТ КРС (по сообщениям граждан). При исследовании проб, отобранных от животных с клиническими признаками заболевания, лабораторно подтвердить диагноз не удалось.

В 2014 г. на территории Карагандинской области не было зафиксировано ни одного случая ИРТ КРС.

В 2015 г. вновь поступили сообщения о подозрении на ИРТ КРС в г. Жезказган. В населенном пункте были проведены ограничительные мероприятия. Как и в 2013 г., данные случаи были проверены лабораторно и получены отрицательные результаты. Стоит отметить, что при возникновении у животных заболевания респираторного характера на территории Жезказгана удалось предотвратить распространение возбудителя.

Новые сообщения граждан о появлении симптомов респираторного заболевания у КРС поступили в 2016 г. из Аманжоловского сельского округа, тогда как другие населенные пункты Каркаралинского района оказались не затронуты. Введение ограничительных мероприятий на территории данного поселения позволило локализовать зафиксированные вспышки заболевания респираторного характера. Необходимо добавить, что при исследовании проб от подозрительных по ИРТ КРС животных диагноз не подтвердился. Другие районы Карагандинской области в 2016 г. оставались благополучными.

В 2017 г. был зафиксирован случай подозрения на ИРТ КРС на территории города Караганда. По решению местного исполнительного органа и главного госветинспектора Карагандинской области в неблагополучном пункте были проведены ограничительные мероприятия, что позволило локализовать эпизоотический очаг и не допустить распространения респираторной инфекции. При исследовании проб биоматериала, отобранного от подозрительных по ИРТ КРС животных, лабораторно подтвердить диагноз не удалось.

В 2018 г. на территории региона сообщений о случаях подозрения на ИРТ КРС не зарегистрировано.

В 2019 г. вновь было зафиксировано несколько сообщений граждан о появлении случаев возможного инфицирования животных вирусом ИРТ КРС в нескольких хозяйствах Ынталинского сельского округа Каркаралинского района. В данном населенном пункте по решению местного исполнительного органа и главного госветинспектора Карагандинской области были проведены ограничительные мероприятия. Однако лабораторно подтвердить диагноз при исследовании проб от подозрительных по ИРТ КРС животных не удалось.

Подобная ситуация может свидетельствовать о бессимптомной, или скрытой, форме течения инфекции среди поголовья в области. Кроме того, персистенция возбудителя ИРТ КРС и развитие инфекционного процесса у животных в стаде тесно связана с понижением иммунного фона организма и, как следствие, формированием восприимчивых к вирусу особей.

Результаты эпизоотологического мониторинга показали, что в 2020 г. на территории Карагандинской

¹ Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. In: WOAH. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Chapter 3.4.11. Режим доступа: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.11_IBR_IPV.pdf.

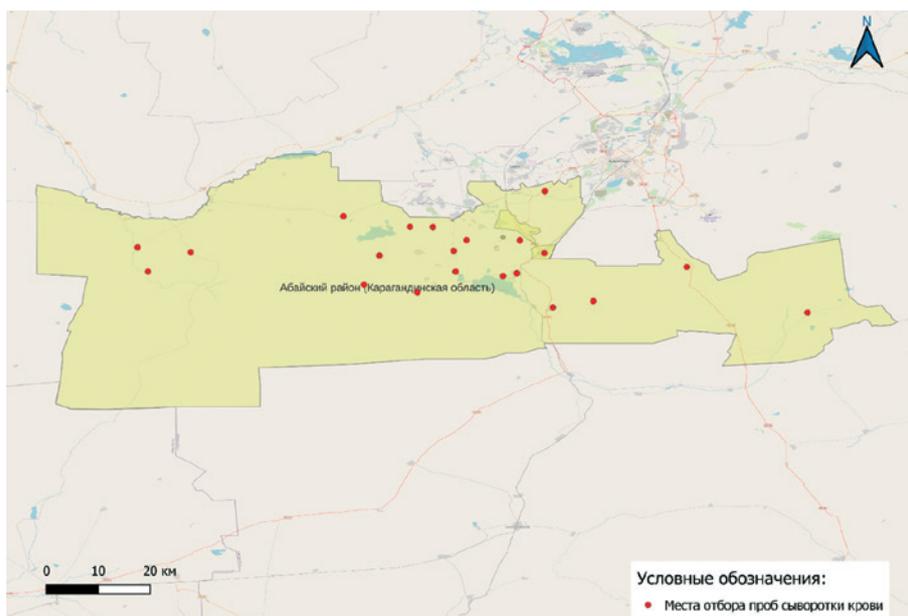


Рис. 1. Точки отбора образцов крови для исследования в Абайском районе Карагандинской области (2021 г.)

Fig. 1. Sampling sites for blood collection in the Abay Raion, the Karaganda Oblast (2021)

области были зарегистрированы новые случаи подозрения на ИРТ КРС в Мибулакском (Улытауский район), Акбастауском (Абайский район) и Куланотпесском (Нуринский район) сельских округах. В указанных населенных пунктах проведены ограничительные мероприятия.

Согласно имеющимся данным, в 2021 г. на территории Карагандинской области было зарегистрировано 7 случаев подозрения на ИРТ КРС. Первый – 06.01.2021 в Тасаралском сельском округе Актогайского района. Однако при лабораторных исследованиях диагностировать заболевание не удалось.

Новое сообщение о подозрении на ИРТ КРС поступило 12.03.2021 из Улытауского района. Несмотря на отрицательные результаты лабораторных исследований, до ноября 2021 г. было зарегистрировано еще 5 сообщений о наличии симптомов заболевания не только в Улытауском и Актогайском, но и в Шетском и Нуринском районах. В Шетском районе, согласно предписанию, провели вакцинацию 2600 гол. КРС и дезинфекцию на 4325 м² площади содержания больных особей.

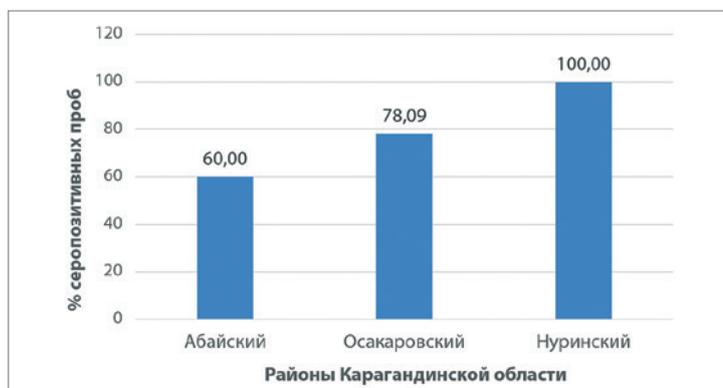


Рис. 2. Соотношение положительных проб в разрезе районов Карагандинской области (2021 г.)

Fig. 2. Proportion of positive samples in the Karaganda Oblast by raions (2021)

Принимая во внимание сложившуюся эпизоотическую ситуацию по ИРТ КРС, в 2021 г. Казахским научно-исследовательским ветеринарным институтом были проведены дополнительные мониторинговые исследования с целью подтверждения или опровержения возможного распространения возбудителя данного заболевания. Так, были подвергнуты обследованию 3 района Карагандинской области: Абайский, Осакаровский и Нуринский.

Расположение эпизоотологических единиц (ЭЕ) для отбора проб в Абайском районе отображены на рисунке 1. Здесь выборка ЭЕ сконцентрирована ближе к г. Караганде, причиной тому служит наибольшее количество населенных пунктов, а соответственно и животных, на территории этого участка района. Аналогичные тенденции просматриваются и при отборе проб в Осакаровском и Нуринском районах. Кроме того, большее внимание уделялось хозяйствующим субъектам, где ранее отмечены сообщения о подозрении на ИРТ КРС.

С целью определения серопревалентности к возбудителю ИРТ КРС в 2021 г. на территории Карагандинской области был проведен отбор 285 образцов сыворотки крови от невакцинированного поголовья. В общей сложности была исследована 21 ЭЕ в каждом из 3 представленных районов региона. Результаты серологического исследования отобранных проб представлены на рисунке 2.

Установлено, что средний показатель серопревалентности у невакцинированных животных 3 районов Карагандинской области составил 79,29%. Следует отметить, что в Абайском и Осакаровском районах, где в 2021 г. случаев подозрения на ИРТ КРС отмечено не было, серопревалентность составила 60 и 78,09% соответственно.

Согласно плану ветеринарно-профилактических мероприятий вакцинация, осуществляемая за счет средств республиканского бюджета, проводилась только в местах, откуда поступали сообщения о подозрении на ИРТ КРС в 2020 или 2021 г. Общая доля иммунизированных животных при этом не превышала 10–15% от общего поголовья в районе. Было проведено

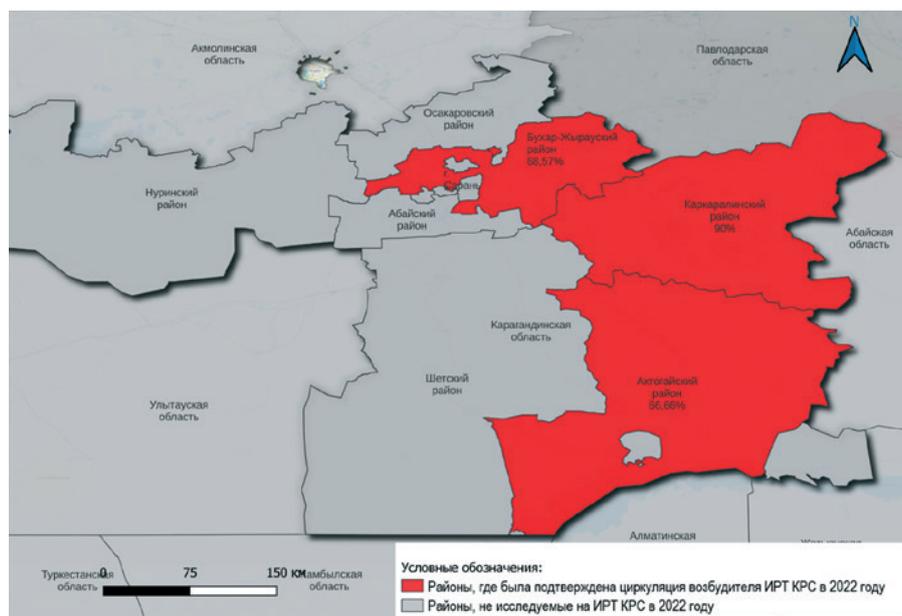


Рис. 3. Серопревалентность к возбудителю ИРТ КРС в 2022 г. (Карагандинская область)

Fig. 3. Seroprevalence against IBR virus in 2022 (Karaganda Oblast)

диагностическое тестирование поголовья, привитого маркированной по иммуноглобулину Е вакциной, что позволяло с помощью DIVA-теста дифференцировать инфицированных животных от вакцинированных.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможной циркуляции возбудителя ИРТ КРС в ряде районов Карагандинской области в 2021 г.

В 2022 г. плановый мониторинг проведен в Бухар-Жырауском, Актогайском и Каркаралинском районах области. В общей сложности были исследованы 21 ЭЕ в каждом из приведенных районов и 285 проб сыворотки крови КРС на наличие антител к возбудителю ИРТ КРС.

Образцы крови были получены от клинически здоровых невакцинированных особей без признаков ИРТ КРС. Выборка формировалась таким образом, чтобы в область исследования были включены ЭЕ как с отмеченными ранее сообщениями о подозрении на ИРТ КРС, так и близлежащие населенные пункты или отгонные участки. Стоит отметить, что для достижения возможного уровня достоверности исследований также были обследованы и населенные пункты или отгонные участки с условным благополучием (никогда не регистрировали ИРТ КРС) по данной инфекции.

В результате серопозитивные к возбудителю ИРТ КРС животные были обнаружены во всех ЭЕ. Полученные данные визуальны представлены на рисунке 3.

Установлено, что минимальный уровень серопревалентности, равный 66,66%, был отмечен в Актогайском районе, где животных для исследования отбирали как из личных подсобных хозяйств, так и крупных фермерских организаций разных форм собственности. Максимальный уровень в 90% зарегистрирован в Каркаралинском районе, 97% исследованных животных в данном районе принадлежали собственникам, содержащим животных в личных подсобных хозяйствах. Серопревалентность в Бухар-Жырауском районе составила 68,57%.

Учитывая, что вакцинопрофилактика против ИРТ КРС проводится в основном в крупных фирмах и на предприятиях животноводческого направления, а частный сектор иммунизирует скот главным образом

за счет средств республиканского бюджета, можно с уверенностью говорить, что шансы отобрать пробы для исследования у нелегально вакцинированного поголовья сводятся к минимуму.

Ввиду изложенного выше можно заключить, что циркуляция возбудителя ИРТ КРС отмечена во всех исследуемых в 2022 г. регионах Карагандинской области.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При изучении эпизоотической обстановки по ИРТ КРС в Карагандинской области Республики Казахстан установили, что регион в 2021–2022 гг. был неблагополучен по заболеваемости. Первое сообщение о возможном наличии ИРТ КРС на территории области зарегистрировано в 2013 г. Дальнейшее распространение инфекции в регионе не носило молниеносный характер. Так, в 2014 г. на территории области не было зафиксировано ни одного случая подозрения на ИРТ КРС. Однако уже в 2015 г. была получена информация о возможном возникновении данного инфекционного заболевания у животных в регионе. Анализ имеющихся данных показал, что с 2013 г. скот на территорию хозяйствующего субъекта, где было зарегистрировано сообщение о наличии животных с клиническими признаками ИРТ КРС, из других ЭЕ не завозился. Данный факт может свидетельствовать о латентном течении инфекции среди поголовья в области. Согласно имеющимся данным, в 2021 г. на территории Карагандинской области было зарегистрировано 7 случаев подозрения на ИРТ КРС. При исследовании сыворотки крови от клинически здоровых и невакцинированных животных установлена высокая серопревалентность к возбудителю ИРТ КРС на территории Нуринского, Абайского и Осакаровского районов, где доля иммунизированных животных не превышала 10–15% от общего поголовья. В 2022 г. плановый мониторинг был проведен в Бухар-Жырауском, Актогайском и Каркаралинском районах области, в общей сложности была обследована 21 ЭЕ в каждом из приведенных районов. Выборка формировалась таким образом, чтобы в область исследования были включены ЭЕ как с отмеченными ранее сообщениями

о подозрении на ИРТ КРС, так и близлежащие населенные пункты или отгонные участки. В результате серопозитивные к возбудителю инфекционного ринотрахеита животные были обнаружены во всех ЭЕ. Таким образом, полученные данные подтверждают факт циркуляции возбудителя ИРТ КРС в следующих районах Карагандинской области: Абайском, Актогайском, Бухар-Жырауском, Каркаралинском, Нурынском и Осакаровском.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Сюрин В. Н., Самуйленко А. Я., Соловьев Б. В., Фомина Н. В. Вирусные болезни животных. М.: ВНИТИБП; 2001. 928 с.
- Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота. *Сельский эксперт*. Режим доступа: <https://selo-exp.com/korovy/infekcionnyj-rinotraxeit-krupnogo-rogatogo-skota.html>.
- Строганова И. Я. Методы контроля размножения и определения инфекционной активности респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота в культурах клеток. *Реконструкция гомеостаза: материалы IX Международного симпозиума (Красноярск, 16–20 марта 1998 г.)*. Красноярск; 1998; 4: 97–99.
- Петрова О. Г., Барашкин М. И., Мильштейн И. М. Эпизоотологический мониторинг респираторных заболеваний у крупного рогатого скота и наносимый фармакологический ущерб. *Теория и практика мировой науки*. 2020; 4: 53–57. EDN: ISEMXXH.
- Iscaro C., Cambiotti V., Petrini S., Feliziani F. Control programs for infectious bovine rhinotracheitis (IBR) in European countries: an overview. *Anim. Health Res. Rev.* 2021; 22 (2): 136–146. DOI: 10.1017/S1466252321000116.
- Sarangli L. N., Chandrasekhar Reddy R. V., Rana S. K., Naveena T., Ponnanna N. M., Sharma G. K. Sero-diagnostic efficacy of various ELISA kits for diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) in cattle and buffaloes in India. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2021; 241:110324. DOI: 10.1016/j.vetimm.2021.110324.
- Сашнина Л. Ю., Владимирово Ю. Ю., Тараканова К. В., Копытина К. О. Оценка эффективности иммунизации нетелей вакцинами Хипрабовис-4 и Комбовак А. *Ветеринарный фармакологический вестник*. 2019; 2 (7): 46–50. DOI: 10.17238/issn2541-8203.2019.2.46.
- Mars M. H., de Jong M. C., van Oirschot J. T. A gE-negative bovine herpesvirus 1 vaccine strain is not re-excreted nor transmitted in an experimental cattle population after corticosteroid treatments. *Vaccine*. 2000; 18 (19): 1975–1981. DOI: 10.1016/S0264-410X(99)00536-8.
- Valas S., Brémaud I., Stourm S., Croisè V., Mémèteau S., Ngwa-Mbot D., Tabouret M. Improvement of eradication program for infectious bovine rhinotracheitis in France inferred by serological monitoring of singleton reactors in certified BoHV1-free herds. *Prev. Vet. Med.* 2019; 171:104743. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2019.104743.
- Mandelik R., Bires J., Ozsvari L., Hodnik J. J., Vilcek S. Infectious bovine rhinotracheitis control program in Slovakia. *Front. Vet. Sci.* 2021; 8:675521. DOI: 10.3389/fvets.2021.675521.
- Красочко В. П., Красочко П. П., Яромчик Я. П. Генетическая вариабельность вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. *Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»*. 2020; 56 (1): 57–60. EDN: QVSAUI.
- Котенева С. В., Нефедченко А. В., Глотова Т. И., Гловот А. Г. Роль респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота в этиологии респираторных болезней на молочных комплексах. *Ветеринария сегодня*. 2021; (1): 38–43. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-1-36-38-43.
- Msolla P. M., Wiseman A., Allan E. M., Selman I. E. Experimental infection of cattle of different ages with infectious bovine rhinotracheitis virus (Strichen strain). *J. Comp. Pathol.* 1983; 93 (2): 205–210. DOI: 10.1016/0021-9975(83)90007-5.
- Белоусова Д. А., Клепова Ю. В., Порываева А. П., Печура Е. В., Нурмиева В. Р. Вакцинопрофилактика респираторных вирусных заболеваний крупного рогатого скота (обзор). *БИО*. 2021; 7 (250): 10–15. EDN: WNTQCU.
- Красочко П. А., Красочко П. П., Красочко И. А., Еремец В. И., Албулов А. И., Черных О. Ю. и др. Способ профилактики инфекционного ринотрахеита у телят. Патент № 2775580 Российская Федерация, МПК А61К 39/12 (2006.01), А61К 35/741 (2015.01), А61Р 31/12 (2006.01). ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина». № 2021127276. Заявл. 15.09.2021. Опубл. 04.07.2022. Бюл. № 19.
- Hou L. N., Wang F. X., Wang Y. X., Guo H., Liu C. Y., Zhao H. Z., et al. Subunit vaccine based on glycoprotein B protects pattern animal Guinea pigs from tissue damage caused by infectious bovine rhinotracheitis virus. *Virus Res.* 2022; 320:198899. DOI: 10.1016/j.virusres.2022.198899.
- Нургазиев Р. З., Боронбаева А. И., Нурманов Ч. А. Серологический мониторинг инфекционного ринотрахеита у КРС. *Вестник Алтайского государственного аграрного университета*. 2021; 2 (196): 61–66. EDN: TNMMNP.

18. Лебедева В. Л. Инфекционные карантинные болезни крупного рогатого скота (реферативный обзор). *Вестник ветеринарии*. 2022; 2 (101): 50–70. EDN: CABRDA.

19. Нефедченко А. В., Котенева С. В., Глотова Т. И., Гловот А. Г. Мониторинг инфицированности спермы быков-производителей вирусами на головном племпредприятии. *Ветеринария*. 2022; 9: 18–23. DOI: 10.30896/0042-4846.2022.25.9.18-23.

20. Nardelli S., Farina G., Lucchini R., Valorz C., Moresco A., Dal Zotto R., Costanzi C. Dynamics of infection and immunity in a dairy cattle population undergoing an eradication programme for infectious bovine rhinotracheitis (IBR). *Prev. Vet. Med.* 2008; 85 (1–2): 68–80. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2008.01.001.

21. Hulyanych M., Nedosekov V., Sobko Yu. Determination of cultural conditions of infectious bovine rhinotracheitis virus strain “BM”. *Annals of Agrarian Science*. 2016; 14 (3): 201–204. DOI: 10.1016/j.aasci.2016.08.004.

22. Ni H., Jia X. X., Wang J., Ran X., Wen X. Mapping a highly conserved linear neutralizing epitope at the N-terminus of the gD glycoprotein of bovine herpesvirus type 1 using a monoclonal antibody. *Microb. Pathog.* 2020; 138:103815. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103815.

23. Wen X., Tong X., Wang M., Wang J., Ni H., Ran X. Protective immunity following vaccination with a recombinant multiple-epitope protein of bovine herpesvirus type 1 in a rabbit model. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020; 104 (7): 3011–3023. DOI: 10.1007/s00253-020-10420-6.

24. Mars M. H., de Jong M. C., Franken P., van Oirschot J. T. Efficacy of a live glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 vaccine in cattle in the field. *Vaccine*. 2001; 19 (15–16): 1924–1930. DOI: 10.1016/S0264-410X(00)00435-7.

25. Graat E. A., de Jong M. C., Frankena K., Franken P. Modelling the effect of surveillance programmes on spread of bovine herpesvirus 1 between certified cattle herds. *Vet. Microbiol.* 2001; 79 (3): 193–208. DOI: 10.1016/S0378-1135(00)00356-4.

26. Пчельников А. В., Яцентюк С. П., Сафина Е. Р. Эпизоотическая ситуация по ИРТ КРС на территории Московской и Тверской областей. *Ветеринария и кормление*. 2021; 2: 38–41. DOI: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2021-2-10.

27. Сюрин В. Н., Смоленский В. И. Биотехнологические методы диагностики и профилактики вирусных болезней животных. *Международный сельскохозяйственный журнал*. 1987; 3: 38–43.

28. Пчельников А. В., Сафина Е. Р. Распространенность вируса ИРТ КРС на территории Московской и Тверской областей. *Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии, биотехнологии и экспорты сырья и продуктов животного происхождения: сборник трудов научно-практической конференции (8 ноября 2022 г.)*. М.: Сельскохозяйственные технологии; 2022; 186–188. DOI: 10.18720/SPBPU/2/z22-27.

29. Евстифеев В. В., Гумеров В. Г., Хусаинов Ф. М., Хусаинова Г. И., Акбашев И. Р., Яковлев С. И. Сероиммунологический мониторинг респираторных и желудочно-кишечных заболеваний крупного рогатого скота в различных скотоводческих хозяйствах Среднего Поволжья за 2019 год. *Международный вестник ветеринарии*. 2021; (1): 18–23. DOI: 10.17238/issn2072-2419.2021.1.18.

30. Maresca C., Scoccia E., Dettori A., Felici A., Guarcini R., Petrini S., et al. National surveillance plan for infectious bovine rhinotracheitis (IBR) in autochthonous Italian cattle breeds: Results of first year of activity. *Vet. Microbiol.* 2018; 219: 150–153. DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.04.013.

REFERENCES

- Syurin V. N., Samuilenko A. Ya., Solov'ev B. V., Fomina N. V. Viral animal diseases. Moscow: VNITIBP; 2001. 928 p. (in Russ.)
- Infekcionnyj rinotrakheit krupnogo rogatogo skota = Infectious bovine rhinotracheitis. *Sel'skij ekspert*. Available at: <https://selo-exp.com/korovy/infekcionnyj-rinotraxeit-krupnogo-rogatogo-skota.html>. (in Russ.)
- Stroganova I. Ya. Metody kontrolya razmnozheniya i opredeleniya infekcionnoi aktivnosti respiratorno-sintsital'nogo virusa krupnogo rogatogo skota v kul'turakh kletok = Methods of reproduction control and infectivity determination of bovine respiratory syncytial virus in cell cultures. *Rekonstruktsiya gomeostaza: materialy IX Mezhdunarodnogo simpoziuma (Krasnoyarsk, 16–20 marta 1998 g.) = Reconstruction of homeostasis: proceedings of IX International Symposium (Krasnoyarsk, 16–20 March 1998)*. Krasnoyarsk; 1998; 4: 97–99. (in Russ.)
- Petrova O. G., Barashkin M. I., Milshtein I. M. Epizootological monitoring of respiratory diseases in cattle and economic damage. *Theory and practice of the world science*. 2020; 4: 53–57. EDN: ISEMXXH. (in Russ.)
- Iscaro C., Cambiotti V., Petrini S., Feliziani F. Control programs for infectious bovine rhinotracheitis (IBR) in European countries: an overview. *Anim. Health Res. Rev.* 2021; 22 (2): 136–146. DOI: 10.1017/S1466252321000116.
- Sarangli L. N., Chandrasekhar Reddy R. V., Rana S. K., Naveena T., Ponnanna N. M., Sharma G. K. Sero-diagnostic efficacy of various ELISA kits for diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) in cattle and buffaloes in India. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2021; 241:110324. DOI: 10.1016/j.vetimm.2021.110324.
- Sashnina L. Yu., Vladimirova J. Yu., Tarakanova K. V., Kopytina K. O. Evaluation of the effectiveness of immunization of heifers with Hiprabovis-4 and

- Combovak A vaccines. *Bulletin of veterinary pharmacology*. 2019; 2 (7): 46–50. DOI: 10.17238/issn2541-8203.2019.2.46. (in Russ.)
8. Mars M. H., de Jong M. C., van Oirschot J. T. A gE-negative bovine herpesvirus 1 vaccine strain is not re-excreted nor transmitted in an experimental cattle population after corticosteroid treatments. *Vaccine*. 2000; 18 (19): 1975–1981. DOI: 10.1016/S0264-410X(99)00536-8.
9. Valas S., Brémaud I., Stourm S., Croisé B., Mémèteau S., Ngwa-Mbot D., Tabouret M. Improvement of eradication program for infectious bovine rhinotracheitis in France inferred by serological monitoring of singleton reactors in certified BoHV1-free herds. *Prev. Vet. Med.* 2019; 171:104743. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2019.104743.
10. Mandelik R., Bires J., Oszvari L., Hodnik J. J., Vilcek S. Infectious bovine rhinotracheitis control program in Slovakia. *Front. Vet. Sci.* 2021; 8:675521. DOI: 10.3389/fvets.2021.675521.
11. Krasochka V. P., Krasochka P. P., Yaromchik Ya. P. Genetic variability of infectious bovine rhinotracheitis virus. *Transactions of the Educational Establishment "Vitebsk the Order of "the Badge of Honor" State Academy of Veterinary Medicine".* 2020; 56 (1): 57–60. EDN: QVSAUI. (in Russ.)
12. Koteneva S. V., Nefedchenko A. V., Glotova T. I., Glotov A. G. Role of bovine respiratory syncytial virus in the etiology of respiratory diseases on milk farms. *Veterinary Science Today*. 2021; (1): 38–43. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-1-36-38-43.
13. Msolla P. M., Wiseman A., Allan E. M., Selman I. E. Experimental infection of cattle of different ages with infectious bovine rhinotracheitis virus (Strichen strain). *J. Comp. Pathol.* 1983; 93 (2): 205–210. DOI: 10.1016/0021-9975(83)90007-5.
14. Belousova D. A., Klepova Yu. V., Poryvaeva A. P., Pechura E. V., Nurmieva V. R. Vaksinooprofilaktika respiratornykh virusnykh zabolevaniy krupnogo rogatogo skota (obzor) = Vaccination for prevention of respiratory viral diseases in cattle (review). *BIO*. 2021; 7 (250): 10–15. EDN: WNTQCU. (in Russ.)
15. Krasochko P. A., Krasochko P. P., Krasochko I. A., Eremets V. I., Albulov A. I., Chernykh O. Yu., et al. Method for prevention of infectious rhinotracheitis in calves. Patent No. 2775580 Russian Federation, Int. Cl. A61K 39/12 (2006.01), A61K 35/741 (2015.01), A61P 31/12 (2006.01). FGBOU VO "Kubanskij gosudarstvennyj agrarnyj universitet imeni I. T. Trubilina". Application: 2021127276. Date of filing: 15.09.2021. Date of publication: 04.07.2022. Bull. No. 19. (in Russ.)
16. Hou L. N., Wang F. X., Wang Y. X., Guo H., Liu C. Y., Zhao H. Z., et al. Subunit vaccine based on glycoprotein B protects pattern animal Guinea pigs from tissue damage caused by infectious bovine rhinotracheitis virus. *Virus Res.* 2022; 320:198899. DOI: 10.1016/j.virusres.2022.198899.
17. Nurgaziyev R. Z., Boronbayeva A. I., Nurmanov Ch. A. Serological monitoring of infectious rhinotracheitis in cattle. *Bulletin of Altai State Agricultural University*. 2021; 2 (196): 61–66. EDN: TNMMNP. (in Russ.)
18. Lebedeva V. L. Infectious quarantine diseases of cattle (abstract review). *Vestnik veterinarii*. 2022; 2 (101): 50–70. EDN: CABRDA. (in Russ.)
19. Nefedchenko A. V., Koteneva S. V., Glotova T. I., Glotov A. G. Monitoring of infection of the semen of bulls with viruses on the artificial insemination center. *Veterinariya*. 2022; 9: 18–23. DOI: 10.30896/0042-4846.2022.25.9.18-23. (in Russ.)
20. Nardelli S., Farina G., Lucchini R., Valorz C., Moresco A., Dal Zotto R., Costanzi C. Dynamics of infection and immunity in a dairy cattle population undergoing an eradication programme for infectious bovine rhinotracheitis (IBR). *Prev. Vet. Med.* 2008; 85 (1–2): 68–80. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2008.01.001.
21. Hulyanich M., Nedosekov V., Sobko Yu. Determination of cultural conditions of infectious bovine rhinotracheitis virus strain "BM". *Annals of Agrarian Science*. 2016; 14 (3): 201–204. DOI: 10.1016/j.aasci.2016.08.004.
22. Ni H., Jia X. X., Wang J., Ran X., Wen X. Mapping a highly conserved linear neutralizing epitope at the N-terminus of the gD glycoprotein of bovine herpesvirus type 1 using a monoclonal antibody. *Microb. Pathog.* 2020; 138:103815. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103815.
23. Wen X., Tong X., Wang M., Wang J., Ni H., Ran X. Protective immunity following vaccination with a recombinant multiple-epitope protein of bovine herpesvirus type 1 in a rabbit model. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020; 104 (7): 3011–3023. DOI: 10.1007/s00253-020-10420-6.
24. Mars M. H., de Jong M. C., Franken P., van Oirschot J. T. Efficacy of a live glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 vaccine in cattle in the field. *Vaccine*. 2001; 19 (15–16): 1924–1930. DOI: 10.1016/S0264-410X(00)00435-7.
25. Graat E. A., de Jong M. C., Frankena K., Franken P. Modelling the effect of surveillance programmes on spread of bovine herpesvirus 1 between certified cattle herds. *Vet. Microbiol.* 2001; 79 (3): 193–208. DOI: 10.1016/S0378-1135(00)00356-4.
26. Pchelnikov A. V., Yatsentyuk S. P., Safina E. R. Epizootic situation on IRT of cattle in the territory of the Moscow and Tver regions. *Veterinaria i kormlenie*. 2021; 2: 38–41. DOI: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2021-2-10. (in Russ.)
27. Syurin V. N., Smolensky V. I. Biotechnologicheskie metody diagnostiki i profilaktiki virusnykh boleznei zhivotnykh = Biotechnological methods for diagnosis and prevention of viral diseases in animals. *International Agricultural Journal*. 1987; 3: 38–43. (in Russ.)
28. Pchelnikov A. V., Safina E. R. Rasprostranennost' virusa IRT KRS na territorii Moskovskoi i Tverskoi oblastei = Prevalence of IBR virus in the Moscow and Tver Oblasts. *Aktual'nye problemy veterinarnoi meditsiny, zootehnii, biotekhnologii i ekspertizy syr'ya i produktov zhivotnogo proiskhozhdeniya: sbornik trudov nauchno-prakticheskoi konferentsii (8 noyabrya 2022 g.) = Topical issues of veterinary medicine, zootechnics, biotechnology and expert examination of raw materials and products of animal origin: collection of proceedings of the scientific and practical conference (November 8, 2022)*. Moscow: Sel'skokhozyaistvennyye tekhnologii; 2022; 186–188. DOI: 10.18720/SPBPU/2/z22-27. (in Russ.)
29. Evstifeev V. V., Gumerov V. G., Khusainov F. M., Khusainova G. I., Akbashiev I. R., Yakovlev S. I. Seroimmunological monitoring of respiratory and gastrointestinal diseases of cattle in various cattle farms of the Middle Volga region for 2019. *International Journal of Veterinary Medicine*. 2021; (1): 18–23. DOI: 10.17238/issn2072-2419.2021.1.18. (in Russ.)
30. Maresca C., Scoccia E., Dettori A., Felici A., Guarcini R., Petrini S., et al. National surveillance plan for infectious bovine rhinotracheitis (IBR) in autochthonous Italian cattle breeds: Results of first year of activity. *Vet. Microbiol.* 2018; 219: 150–153. DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.04.013.

Поступила в редакцию / Received 24.03.2023

Поступила после рецензирования / Revised 04.04.2023

Принята к публикации / Accepted 10.07.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Кирпиченко Владимир Владимирович, кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией вирусологии ТОО «КазНИВИ», г. Алматы, Республика Казахстан; <https://orcid.org/0000-0002-2494-3826>, e-mail: vlad_92reik@mail.ru.

Бакиева Флюра Альбертовна, кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией бактериологии ТОО «КазНИВИ», г. Алматы, Республика Казахстан; <https://orcid.org/0000-0003-0627-2608>, e-mail: flurachka-78@mail.ru.

Маманова Салтанат Бекбосыновна, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник ТОО «КазНИВИ», г. Алматы, Республика Казахстан; <https://orcid.org/0000-0003-2317-8779>, e-mail: sal.71@mail.ru.

Оспанов Ержан Калиолдинович, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник ТОО «КазНИВИ», г. Алматы, Республика Казахстан; <https://orcid.org/0000-0001-6903-3570>, e-mail: ergan_68@mail.ru.

Каймолдина Сайра Есимбаевна, магистр ветеринарных наук, младший научный сотрудник ТОО «КазНИВИ», г. Алматы, Республика Казахстан; <https://orcid.org/0000-0002-7658-5805>, e-mail: sayra_kaymoldina@mail.ru.

Vladimir V. Kirpichenko, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of the Virology Laboratory, LLP "KazNIVI", Almaty, Republic of Kazakhstan; <https://orcid.org/0000-0002-2494-3826>, e-mail: vlad_92reik@mail.ru.

Flyura A. Bakieva, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Bacteriology Laboratory, LLP "KazNIVI", Almaty, Republic of Kazakhstan; <https://orcid.org/0000-0003-0627-2608>, e-mail: flurachka-78@mail.ru.

Saltanat B. Mamanova, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, LLP "KazNIVI", Almaty, Republic of Kazakhstan; <https://orcid.org/0000-0003-2317-8779>, e-mail: sal.71@mail.ru.

Erzhan K. Ospanov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, LLP "KazNIVI", Almaty, Republic of Kazakhstan; <https://orcid.org/0000-0001-6903-3570>, e-mail: ergan_68@mail.ru.

Saira E. Kaimoldina, Master of Science (Veterinary Medicine), Junior Researcher, LLP "KazNIVI", Almaty, Republic of Kazakhstan; <https://orcid.org/0000-0002-7658-5805>, e-mail: sayra_kaymoldina@mail.ru.



Особенности реализации противоэпизоотических мероприятий по африканской чуме свиней в Китае

М. Д. Лозовой, С. В. Щербинин, А. К. Караулов

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

РЕЗЮМЕ

Африканская чума свиней – вирусная болезнь свиней, обладающая высокой скоростью распространения, против которой не разработано средств специфической профилактики. Китайская Народная Республика является первой страной в Юго-Восточной Азии, где в 2018 г. была официально зарегистрирована вспышка данного заболевания, наносящего в настоящее время значительный экономический ущерб многим странам мира. Болезнь в дальнейшем распространилась на все провинции страны, где общее количество очагов среди домашних свиней составило 200, а в популяции диких кабанов – 10, при этом общее поголовье свиней в стране катастрофически сократилось – примерно на 180 млн голов. С момента выявления первого очага африканской чумы свиней Министерством сельского хозяйства и сельских дел Китая был принят «План действий в чрезвычайных ситуациях по борьбе с африканской чумой свиней и уровень реагирования на чрезвычайные ситуации», выполнение которого обеспечило ликвидацию эпизоотии, и уже к 2023 г. выявление новых очагов инфекции в стране прекратилось. Страна с одной из самых объемных свиноводческих отраслей животноводства в мире добилась, в сравнении с Европой, показателей довольно среднего распространения эпизоотии. При этом на территории Китая циркулировали штаммы вируса африканской чумы свиней с высоким генетическим разнообразием и с различным уровнем вирулентности, что обуславливало широкий спектр клинических симптомов у заболевших животных. Подобные особенности должны были только усложнить проведение ликвидационных мероприятий, однако разработанные меры доказали свою эффективность. Опыт осуществления противоэпизоотических мероприятий в Китае, безусловно, представляет интерес и для нашей страны, неблагополучной по африканской чуме свиней с 2008 г.

Ключевые слова: африканская чума свиней, распространение инфекции, эпизоотическая ситуация, противоэпизоотические мероприятия, КНР

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

Для цитирования: Лозовой М. Д., Щербинин С. В., Караулов А. К. Особенности реализации противоэпизоотических мероприятий по африканской чуме свиней в Китае. *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (3): 240–245. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-240-245.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Лозовой Михаил Дмитриевич, аспирант, информационно-аналитический центр ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: g4dery@gmail.com.

Specific features of African swine fever control activities in China

M. D. Lozovoy, S. V. Shcherbinin, A. K. Karaulov

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

SUMMARY

African swine fever is a highly contagious viral disease of pigs; however, no vaccines are available to control it. Currently the disease causes significant economic damage in many countries. The Republic of China is the first country in Southeast Asia, which officially reported the African swine fever outbreak in 2018. The disease further spread to all provinces of the country with 200 outbreaks in domestic pigs and 10 outbreaks in wild boar in total; herewith the overall population of pigs decreased dramatically, approximately by 180 million animals. Following the confirmation of the first African swine fever outbreak, the PRC Ministry of Agriculture and Rural Affairs launched the “African Swine Fever Contingency Plan and Emergency Response”, which facilitated the disease eradication and already by 2023, no new infection outbreaks had been reported. The country with the largest swine population in the world achieved rather moderate spread rates if compared to Europe. In addition, the virus strains, which circulated in the Chinese territory, were genetically diverse and different in virulence, leading to a wide range of clinical signs manifested by diseased animals. Such aspects were supposed to complicate the eradication measures, but instead, they proved their effectiveness. The experience gained from the disease control in China is most certainly of interest for the Russian Federation, infected with African swine fever since 2008.

Keywords: African swine fever, infection spread, epidemic situation, disease control measures, Republic of China

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

For citation: Lozovoy M. D., Shcherbinin S. V., Karaulov A. K. Specific features of African swine fever control activities in China. *Veterinary Science Today*. 2023; 12 (3): 240–245. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-240-245.

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

For correspondence: Mikhail D. Lozovoy, Postgraduate Student, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: g4dery@gmail.com.

ВВЕДЕНИЕ

В Российской Федерации, в связи со складывающейся в последнее время мировой политической и социально-экономической обстановкой, четко наметилась тенденция на значительное увеличение контактов со странами Юго-Восточной Азии. В сфере ветеринарии, на наш взгляд, это в первую очередь контакты в области профилактики и борьбы с особо опасными болезнями животных, потенциально наносящими значительный экономический ущерб животноводческой отрасли стран. В этом плане, безусловно, представляет интерес опыт Китая по борьбе с африканской чумой свиней (АЧС), этой опустошительной панзоотией, наносящей огромный ущерб свиноводству многих стран мира, эффективных средств специфической профилактики которой до сих пор не разработано.

Интерес к особенностям осуществления противоэпизоотических мероприятий по АЧС в Китае объясняется прежде всего тем, что это страна обладает одной из самых объемных свиноводческих отраслей животноводства в мире, но при этом за относительно короткий период времени она сумела свести распространение болезни к минимуму, тогда как большинство европейских стран с современной высокоразвитой системой ведения животноводства так пока и не справились с распространением АЧС на своих территориях.

Более того, вплоть до настоящего времени инфекция постепенно продвигается на запад Европы. В 2014 г. АЧС была зарегистрирована в Польше, Литве, Эстонии, в 2016 г. – в Молдавии, в 2017 г. – в Чехии и Румынии, в 2018 г. – в Венгрии, Болгарии и Бельгии, в 2019 г. – в Сербии и Словакии. В 2020 г. о возникновении вспышки АЧС сообщили Греция и Германия, в 2021 г. – Северная Македония, в 2022 г. – Италия [1].

По данным информационного агентства «Блумберг», в Европейском союзе с 2014 г. вспышки АЧС распространялись по всему региону со скоростью около 200 км в год, что, по оценкам, приводит к ежегодным потерям в несколько миллиардов евро [2].

Цель работы – обзор опыта по ликвидации вспышек АЧС в Китае для обозначения ключевых компонентов противоэпизоотической работы для региональных ветеринарных служб России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведен обзор зарубежной научной литературы и перевод публикаций по распространению АЧС в Китае с китайского языка на русский.

Данные по эпизоотической ситуации были получены из официальных отчетов Всемирной организации здравоохранения животных (ВОЗЖ) [1] и включали в себя дату и место вспышек АЧС, координаты неблагополучных пунктов для отображения их на карте.

Информация о плотности популяции свиней на территории Китая была предоставлена Министерством сельского хозяйства и сельских дел КНР и использовалась для расчета относительного риска возникновения новых вспышек АЧС на территории Китая.

С помощью программы ArcGIS (Esri, США) получен картографический материал, где отображены неблагополучные по АЧС страны, пораженные провинции Китая, указано географическое расположение вспышек, а также проведен анализ риска распространения болезни на территории Юго-Восточной Азии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первый случай АЧС на территории Китая был зарегистрирован 1 августа 2018 г. [3], когда болезнь, вышедшая за пределы своего естественного африканского нозоареала еще в 1957–1970 гг., уже получила значительное распространение на территории Европы и других регионов (рис. 1).

Факт появления АЧС в Китае расценивается как первое проявление заболевания в странах Юго-Восточной Азии, так как следующие вспышки были зарегистрированы позднее: Монголия – в январе 2019 г., Камбоджа – в марте 2019 г., Гонконг и КНДР – в мае 2019 г., Лаос – в июне 2019 г., Филиппины – в июле 2019 г., Мьянма – в августе 2019 г., Южная Корея – в сентябре 2019 г., Индонезия – в ноябре 2019 г., Папуа – Новая Гвинея – в марте 2020 г., Индия – в мае 2020 г. В 2021 г. АЧС была зафиксирована в Бутане, Малайзии, Таиланде, в 2022 г. – в Непале.

В странах Юго-Восточной Азии насчитывается самое большое количество свиней в мире (рис. 2), которое только в Китае составляет около 50% мирового поголовья данного вида животных. При этом в стране большая часть ферм, от 80 до 90%, представляют собой небольшие хозяйства и приусадебные фермы, которые производят не более 500 гол. свиней в год и крайне подвержены риску заноса инфекций ввиду недостатка мер, направленных на обеспечение биобезопасности. В 2017 г. в Китае было откормлено 688,61 млн свиней, что составляет примерно 48% мирового производства свинины, а уже в 2019 г. отмечено падение объемов откорма до 310,4 млн гол. вследствие возникновения АЧС [4].

С момента первого официального сообщения в августе 2018 г. об АЧС в северо-восточной провинции Китая Ляонин заболевание стремительно распространялось по стране [5]. Из 22 провинций, 5 автономных районов и 4 муниципалитетов континентального Китая на 8 октября 2018 г. [5, 6] в 7 провинциях: Аньхой, Хэйлунцзян, Хэнань, Цзилинь, Ляонин, Цзянси, Чжэцзян и в автономном районе Внутренняя Монголия (рис. 3) – было выявлено 33 вспышки АЧС, но уже по состоянию на 7 декабря 2018 г. болезнь распространилась также на провинции Гуандун, Фуцзянь, Хубэй, Шаньси, Юньнань и Сычуань, где были поражены 50 объектов (ферм/скотобоев).

На конец 2018 г. в стране в общей сложности было зарегистрировано 102 вспышки АЧС среди домашних свиней и 2 – среди диких кабанов в 23 провинциях / автономных районах / муниципалитетах (рис. 4).

Распространение инфекции продолжалось, и в 2019 г. в число неблагополучных по АЧС вошли провинции Хунань, Гуйчжоу, Цзянси, Цинхай, Ганьсу

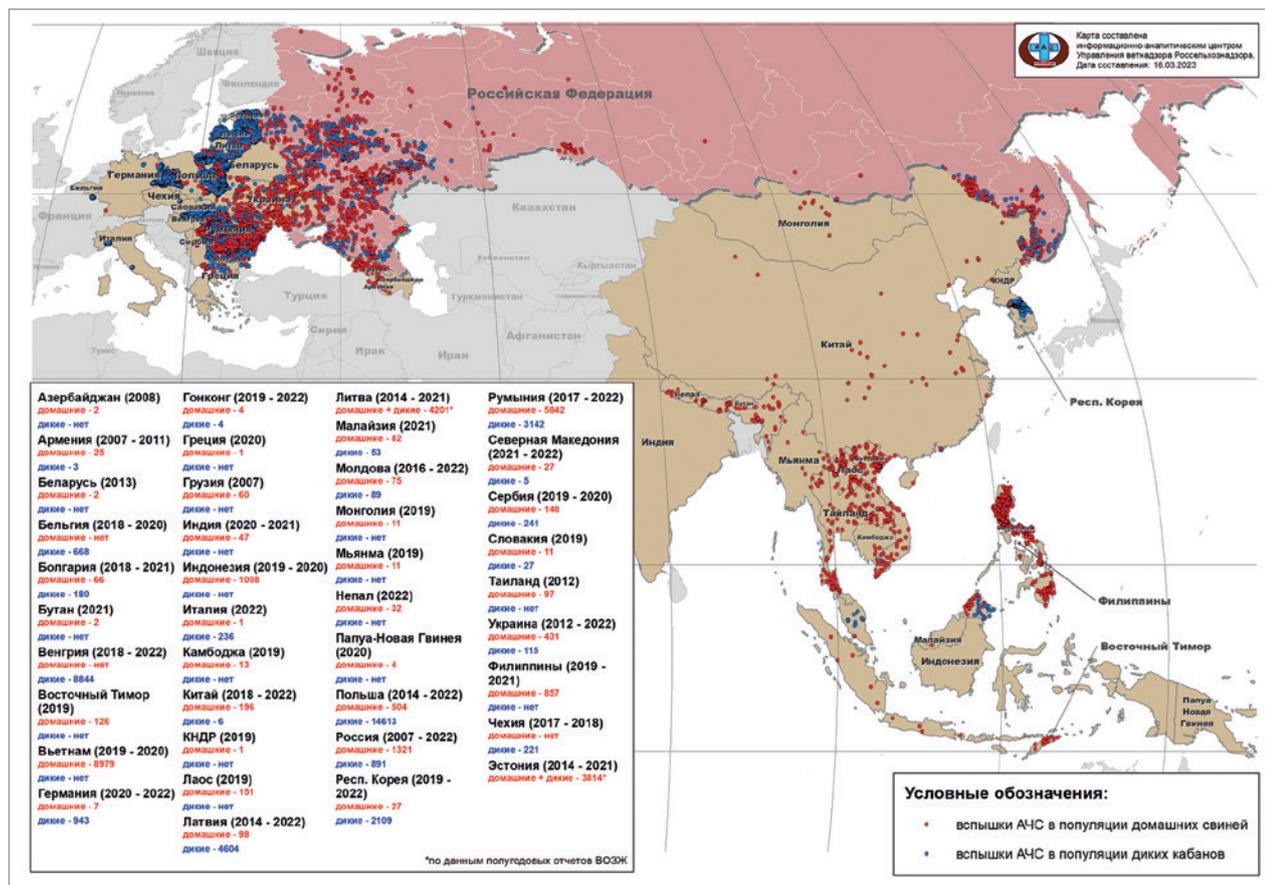


Рис. 1. Эпизоотическая ситуация по АЧС в РФ, странах Европы и Азии в 2007–2022 гг. (по данным срочных сообщений ВОЗЖ на 30.11.2022 г.)

Fig. 1. ASF situation in the Russian Federation, European and Asian countries in 2007–2022 (based on urgent notifications to the WOAH as of November 30, 2022)

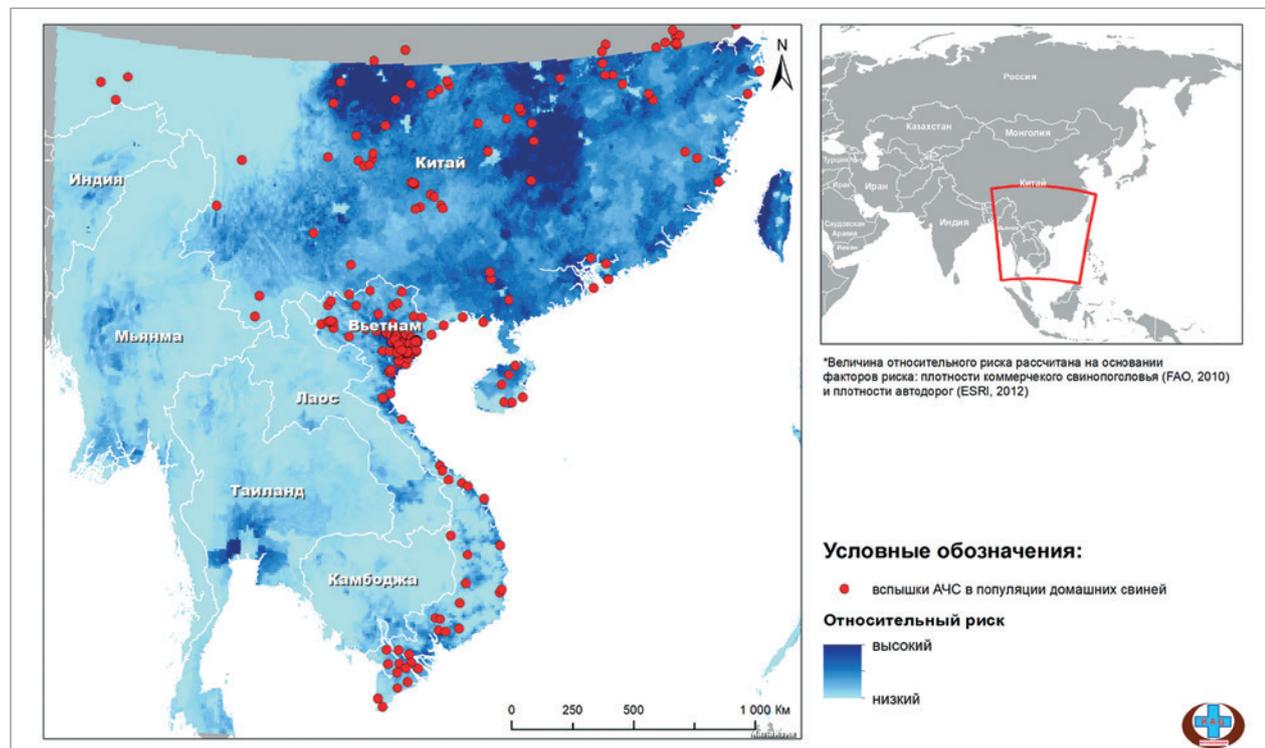


Рис. 2. Плотность популяции свиней и относительный риск распространения АЧС на территории стран Юго-Восточной Азии

Fig. 2. Pig population density and relative risk of ASF spread in Southeast Asia countries

и Шаньдун, а также Нинся-Хуэйский и Гуанси-Чжуанский автономные районы и муниципалитеты Тяньцзинь, Чунцин, Шанхай и Пекин. В общей сложности на 27 декабря 2019 г. с начала эпизоотии АЧС число выявленных в стране очагов увеличилось до 165, из них 4 – среди диких кабанов [7, 8].

В 2020 г. в тех же провинциях, что и ранее, было выявлено 33 вспышки среди домашних свиней и 2 – среди диких кабанов, в 2021 г. зарегистрировано 4 случая АЧС среди домашних свиней и 4 – среди кабанов, а в 2022 г. – одна вспышка АЧС среди домашних свиней в Синьцзян-Уйгурском автономном регионе.

Таким образом, вспышки АЧС в Китае со времени первого появления в августе 2018 г. и по 2023 г. были зарегистрированы практически во всех административных регионах страны, общее количество очагов среди домашних свиней составило 200, а в популяции диких кабанов – 10 (рис. 5).

По сравнению с другими, в частности европейскими, странами это показатели довольно среднего распространения эпизоотии, но, в связи с гибелью пораженных животных в очагах и принятой в Китае системой противоэпизоотических мероприятий по предотвращению распространения инфекции с убоем свиней в угрожаемых регионах, общее поголовье свиней в стране катастрофически сократилось – примерно на 180 млн голов.

Одной из особенностей эпизоотии в Китае является то, что на территории страны циркулировали штаммы вируса АЧС с высоким генетическим разнообразием и различным уровнем вирулентности, что обуславливало широкий спектр клинических симптомов у заболевших животных.

Проведенные X. Wen et al. [9] исследования показали, что геном вируса, вызвавшего вспышку в Китае в 2018 г. (China 2018/1), имел наибольшее сходство

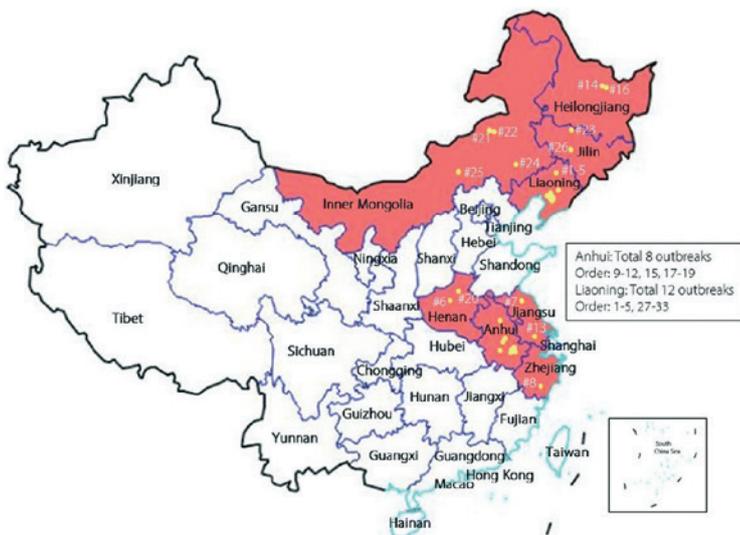


Рис. 3. Неблагополучные по АЧС регионы Китая в августе – октябре 2018 г. [5]

Fig. 3. ASF infected regions of China in August – October 2018 [5]

с геномом вируса АЧС, выделенного в Польше (GenBank: MG939588.1).

По результатам филогенетического анализа 66 штаммов, выделенных в 2019–2020 гг. в южной провинции Гуанси, были сгруппированы и отнесены к 8 различным вариантам, причем 3 из них принадлежали к генотипу 1 и 6 – к генотипу 2 (p72), серогруппе 8 (CD2v) [10], а в провинциях Хэнань и Шаньдун были выделены 2 негемадсорбирующих штамма вируса АЧС (HeN/ZZ-P1/21 и SD/DY-I/21), относящихся к генотипу 1, с низкой вирулентностью, вызывающие у свиней хроническое течение болезни [11–13].



Рис. 4. Эпизоотическая ситуация по АЧС в Китае в 2018 г.

Fig. 4. ASF situation in China in 2018



Рис. 5. Эпизоотическая ситуация по АЧС в Китае с августа 2018 г. по 23 января 2023 г.

Fig. 5. ASF situation in China from August 2018 to January 23, 2023

Китайские штаммы со сниженной патогенностью, отнесенные к генотипу 1, были идентичны штаммам, выделенным в 60-х годах прошлого века в Португалии и Испании, а циркулирующий в Китае с 2018 г. вирус генотипа 2 был подобен высоковирулентным изолятам Georgia 2007/1, Krasnodar 2012, Estonia 2014 вируса АЧС [10, 14, 15].

С момента выявления первого очага АЧС Министерством сельского хозяйства и сельских дел Китая принят «План действий в чрезвычайных ситуациях по борьбе с африканской чумой свиней и уровень реагирования на чрезвычайные ситуации» [16], предусматривающий комплекс мер по осуществлению противоэпизоотических мероприятий в стране. Правительство установило эпизоотическую зону протяженностью 3 км и буферную зону протяженностью 10 км вокруг эпизоотических зон. Были введены строгие правила и меры по ка-

рантинированию, ограничению перемещения свиней и свиноводческой продукции внутри страны, надзору за границами зон содержания животных, обязательному убою всего поголовья заболевших и контактировавших с ними свиней, а также в радиусе 3 км от зоны заражения, утилизации туш.

Был создан межсекторальный механизм взаимодействия, координирующий работу различных ведомств в деле профилактики АЧС и борьбы с ней, создана многоплановая программа эпизоотологического мониторинга, включающая разработку диагностических тестов для специфического и раннего выявления случаев заражения животных, генетический анализ выделяемых изолятов вируса, а также обследование территорий обитания диких кабанов, сбор клещей. Повсеместно была введена компенсация за уведомление о случаях заболевания, падежа животных и принудительный убой до 1200 юаней за голову (около 175 долларов США).

Принятые меры и прежде всего, на наш взгляд, комплекс запретительных мероприятий, применение массового уоя свиноголовья в пораженных и угрожаемых зонах, гибкая система компенсационных выплат и др. обеспечили значительное улучшение эпизоотической обстановки по АЧС в Китае, и уже в феврале 2020 г. китайские власти заявили, что эпизоотическая ситуация по АЧС в стране стабилизировалась [16], а к 2023 г. выявление новых очагов АЧС в стране прекратилось, хотя, по сообщениям ИА Красная Весна, в феврале – марте 2023 г. регистрировали единичную вспышку АЧС в Гонконге и несколько вспышек в провинциях Шаньдун и Хэбэй, где болезнь у животных протекала в легкой клинической форме [17, 18].

Более того, уже к концу 2021 г. (рис. 6) практически восстановилась и численность свиноголовья в стране, составившая 449,2 млн гол. [19].

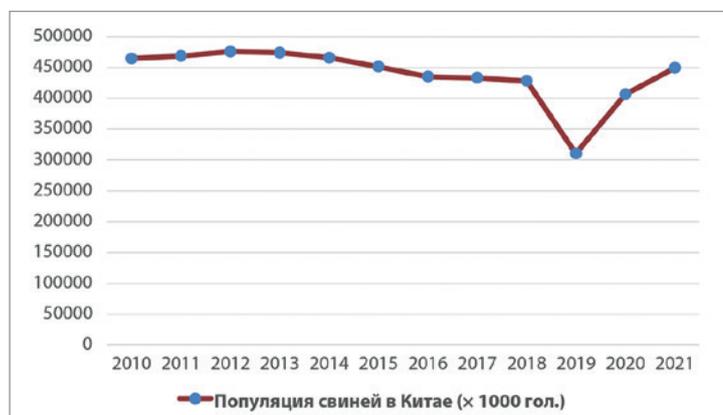


Рис. 6. Численность поголовья свиней в Китае в 2010–2021 гг. [19]

Fig. 6. Pig population numbers in China in 2010–2021 [19]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Опыт ликвидации АЧС в Китае свидетельствует, что борьба с этой опустошительной панзоотией может быть успешной в пределах всей страны и без применения средств специфической профилактики, но должна быть связана с жесткими санитарными ограничениями при расходовании огромных финансовых средств. В то же время в каждой стране наработаны свои собственные приемы борьбы, которые могут быть применены и в других странах. Считаем, что опыт осуществления противоэпизоотических мероприятий при АЧС в Китае, с учетом циркуляции на его территории вируса АЧС 1-го и 2-го генотипов, должен быть подвергнут более тщательному осмыслению и в России для возможного его использования в таких регионах страны, как, например, Дальневосточный. В первую очередь в этом плане представляет интерес опыт Китая по реализации жесткой централизованной стратегии борьбы и профилактики АЧС на всей территории страны, значительному повышению роли местных административных органов в организации и контроле проводимых общих и специфических противоэпизоотических мероприятий, введению продуманной системы компенсационных выплат при массовом убое свиноголового с целью недопущения распространения инфекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. WOAH. World Animal Health Information System (WAHIS Interface). Режим доступа: <https://wahis.woah.org/#/event-management>.
2. The deadly pig virus that's proving difficult to beat. *Bloomberg*. Режим доступа: <https://www.bloomberg.com/news/articles/2018-08-23/the-deadly-african-virus-that-s-killing-chinese-pigs-quicktake>.
3. Wang Q., Ren W., Bao J., Ge S., Li J., Li L., et al. The first outbreak of African swine fever was confirmed in China. *Chinese Journal of Animal Health Inspection*. 2018; 35 (9): 1–4. (in Chinese)
4. Normile D. Can China, the world's biggest pork producer, contain a fatal pig virus? Scientists fear the worst. *Science*. 2018; Aug. 21. DOI: 10.1126/science.aav1776.
5. Wang T., Sun Y., Qiu H. J. African swine fever: an unprecedented disaster and challenge to China. *Infect. Dis. Poverty*. 2018; 7 (1):111. DOI: 10.1186/s40249-018-0495-3.
6. Zhou X., Li N., Luo Y., Liu Y., Miao F., Chen T., et al. Emergence of African swine fever in China, 2018. *Transbound. Emerg. Dis.* 2018. 65 (6): 1482–1484. DOI: 10.1111/tbed.12989.
7. Li L., Ren Z., Wang Q., Ge S., Liu Y., Liu C., et al. Infection of African swine fever in wild boar, China, 2018. *Transbound. Emerg. Dis.* 2019; 66 (3): 1395–1398. DOI: 10.1111/tbed.13114.

8. Tao D., Sun D., Liu Y., Wei S., Yang Z., An T., et al. One year of African swine fever outbreak in China. *Acta Trop.* 2020; 211:105602. DOI: 10.1016/j.actatropica.2020.105602.

9. Wen X., He X., Zhang X., Zhang X., Liu L., Guan Y., et al. Genome sequences derived from pig and dried blood pig feed samples provide important insights into the transmission of African swine fever virus in China in 2018. *Emerg. Microbes Infect.* 2019; 8 (1): 303–306. DOI: 10.1080/22221751.2019.156591510.

10. Shi K., Liu H., Yin Y., Si H., Long F., Feng S. Molecular characterization of African swine fever virus from 2019–2020 outbreaks in Guangxi Province, Southern China. *Front. Vet. Sci.* 2022; 9:912224. DOI: 10.3389/fvets.2022.912224.

11. Chen W., Zhao D., He X., Liu R., Wang Z., Zhang X., et al. A seven-gene-deleted African swine fever virus is safe and effective as a live attenuated vaccine in pigs. *Sci. China. Life Sci.* 2020; 63 (5): 623–634. DOI: 10.1007/s11427-020-1657-9.

12. Shi E., Huang L., Zhang X., Zhang J., Shen D., Zhang Z., et al. Genotype I African swine fever viruses emerged in domestic pigs in China and caused chronic infection. *Emerg. Microbes Infect.* 2021; 10 (1): 2183–2193. DOI: 10.1080/22221751.2021.1999779.

13. Sun E., Zhang Z., Wang Z., He X., Zhang X., Wang L., et al. Emergence and prevalence of naturally occurring lower virulent African swine fever viruses in domestic pigs in China in 2020. *Sci. China. Life Sci.* 2021; 64 (5): 752–765. DOI: 10.1007/s11427-021-1904-4.

14. Wang X., Wang X., Zhang X., He S., Chen Y., Liu X., et al. Genetic characterization and variation of African swine fever virus China/GD/2019 strain in domestic pigs. *Pathogens*. 2022; 11 (1):97. DOI: 10.3390/pathogens11010097.

15. Ge S., Li J., Fan X., Liu F., Li L., Wang Q., et al. Molecular characterization of African swine fever virus, China, 2018. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24 (11): 2131–2133. DOI: 10.3201/eid2411.181274.

16. Ma M., Wang H. H., Hua Y., Qin F., Yang J. African swine fever in China: Impacts, responses, and policy implications. *Food Policy*. 2021; 102:102065. DOI: 10.1016/j.foodpol.2021.102065.

17. В Гонконге зафиксирована африканская чума свиней. *ИА Красная Весна*. 2023; 13 февраля. Режим доступа: <https://rossaprimavera.ru/news/225111c2>.

African swine fever reported in Hong Kong. *IA Krasnaya Vesna*. 2023; February 13. Available at: <https://rossaprimavera.ru/news/225111c2>. (in Russ.)

18. В Голландии негативно оценили борьбу Китая с африканской чумой свиней. *ИА Красная Весна*. 2023; 22 марта. Режим доступа: <https://rossaprimavera.ru/news/95777e64>.

African swine fever control in China was negatively assessed by the Netherlands. *IA Krasnaya Vesna*. 2023; March 22. Available at: <https://rossaprimavera.ru/news/95777e64>. (in Russ.)

19. Ежегодная статистика свиней – Всего свиней. *Pig333*. Режим доступа: <https://www.pig333.ru/pig-production-data/graficos/#5>.

Annual pig census – Total number of pigs. *Pig333*. Available at: <https://www.pig333.ru/pig-production-data/graficos/#5>.

Поступила в редакцию / Received 19.05.2023

Поступила после рецензирования / Revised 27.06.2023

Принята к публикации / Accepted 14.08.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Лозовой Михаил Дмитриевич, аспирант, информационно-аналитический центр ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0009-0003-6229-557X>, e-mail: g4dery@gmail.com.

Щербинин Сергей Владимирович, научный сотрудник информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-6434-0683>, e-mail: sherbinin@arriah.ru.

Караулов Антон Константинович, кандидат ветеринарных наук, руководитель информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-5731-5762>, e-mail: karaulov@arriah.ru.

Mikhail D. Lozovoy, Postgraduate Student, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0009-0003-6229-557X>, e-mail: g4dery@gmail.com.

Sergey V. Shcherbinin, Researcher, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-6434-0683>, e-mail: sherbinin@arriah.ru.

Anton K. Karaulov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-5731-5762>, e-mail: karaulov@arriah.ru.



Сочетанное применение поливалентной сыворотки и иммуномодуляторов в ранний постнатальный период выращивания телят

Н. В. Шаньшин

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт пантового оленеводства» – отдел ФГБНУ «Федеральный Алтайский научный центр агrobiотехнологий» (ВНИИПО – отдел ФГБНУ ФАНЦА), г. Барнаул, Алтайский край, Россия

РЕЗЮМЕ

Представлены данные о влиянии сочетанного применения поливалентной сыворотки и иммуномодулирующих препаратов на заболеваемость, сохранность, резистентность в ранний постнатальный период выращивания телят. Задачами исследования было: изучение влияния комбинированного введения поливалентной сыворотки и иммуномодуляторов на динамику морфобиохимических, иммунологических показателей крови телят; определение оптимального сочетания, кратности введения поливалентной сыворотки и иммуномодуляторов для повышения общей резистентности организма, сохранности телят в ранний постнатальный период выращивания; расчет экономической эффективности применения поливалентной сыворотки и иммуномодуляторов. Научно-производственный опыт проведен на телятах симментальской породы. Для этого сформировали одну контрольную и пять опытных групп, содержащих не менее 5 особей в каждой. Телятам контрольной группы однократно подкожно в первый день жизни вводили поливалентную сыворотку в дозе 20,0 мл, животным опытных групп – сыворотку и иммуномодуляторы в дозах согласно наставлению по их применению. На основании полученных результатов сделан вывод, что оптимальными протоколами являются: однократное введение в первый день жизни «Риботана» в комбинации с сывороткой, а также двукратное введение через 7 дней поливалентной сыворотки с чередованием «Фоспренила» и «Имунофана». Инъекции новорожденным телятам поливалентной сыворотки в комбинации с иммуномодулятором позволяют снизить заболеваемость телят на 70,0%, добиться 100,0%-й сохранности, улучшив данный показатель на 22,3% по сравнению с контролем. Экономическая эффективность ветеринарных мероприятий в результате использования указанных протоколов на 1 рубль затрат в среднем составила 25,29 рубля. Для повышения уровня неспецифической резистентности организма телят в ранний постнатальный период выращивания предпочтение необходимо отдавать препаратам, способным не только нормализовать работу иммунной системы, но и оказывать комплексное положительное воздействие на гомеостаз в целом, стимулировать рост и развитие молодняка на ранних этапах онтогенеза.

Ключевые слова: иммуномодуляторы, поливалентная сыворотка, телята, заболеваемость, сохранность, резистентность

Для цитирования: Шаньшин Н. В. Сочетанное применение поливалентной сыворотки и иммуномодуляторов в ранний постнатальный период выращивания телят. *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (3): 246–252. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-246-252.

Конфликт интересов: Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Шаньшин Николай Васильевич, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории разведения и болезней животных ВНИИПО – отдела ФГБНУ ФАНЦА, 656031, Россия, Алтайский край, г. Барнаул, ул. Шевченко, 160, e-mail: shanshin_2012@rambler.ru.

Joint use of polyvalent serum and immunomodulators for calves in early postnatal period

N. V. Shanshin

All-Russian Research Institute of Antler Reindeer Breeding – Department of the Federal Altai Scientific Center for Agrobiotechnologies, Barnaul, Altai Krai, Russia

SUMMARY

The paper demonstrates how a joint use of polyvalent serum and immunomodulators affects morbidity, survival, and resistance of calves in the early postnatal period. The objectives of the research are: to study how a joint administration of polyvalent serum and immunomodulators changes dynamics of morpho-biochemical and immunological blood parameters in calves; to determine an optimal ratio between the polyvalent serum and immunomodulators and frequency of administration so that to increase overall body resistance, ensure survival of calves in the early postnatal period; to assess cost-effectiveness of the joint use of polyvalent serum and immunomodulators. Research and production testing was done in Simmental calves. For this purpose one control group and five experimental groups were formed (at least 5 animals in each group). Polyvalent serum (20.0 mL) was once administered subcutaneously to the control calves on the first day of life and the animals of the experimental groups received the serum and immunomodulators according to the relevant dosing instructions. The obtained results demonstrate that the optimal protocols include a single administration of “Ribotan” in combination with serum on the first day of life, as well as a double administration of a polyvalent serum 7 days later, alternating “Fosprenil” with “Immunophane”. Administration of polyvalent serum together with an immunomodulator to newborn calves can reduce the morbidity by 70.0% and achieve 100.0% survival, improving this indicator by 22.3% compared to the control. Cost-effectiveness assessment of the veterinary measures specified in these protocols shows that each rouble spent on the measures saves 25.29 roubles. To increase nonspecific resistance of calves in the

early postnatal period, preference shall be given to those veterinary medicinal product that can not only normalize the immune system, but also have a combined positive effect on homeostasis in general, stimulate the growth and development of young animals at the early stages of ontogenesis.

Keywords: immunomodulators, polyvalent serum, calves, morbidity, survival, resistance

For citation: Shanshin N. V. Joint use of polyvalent serum and immunomodulators for calves in early postnatal period. *Veterinary Science Today*. 2023; 12 (3): 246–252. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-246-252.

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

For correspondence: Nikolay V. Shanshin, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Animal Breeding and Diseases, All-Russian Research Institute of Antler Reindeer Breeding – Department of the Federal Altai Scientific Center for Agrobiotechnologies, 656031, Russia, Altai Krai, Barnaul, ul. Shevchenko, 160, e-mail: shanshin_2012@rambler.ru.

ВВЕДЕНИЕ

В современных условиях ведения животноводства неизбежны проблемы, связанные с кормлением, содержанием новорожденного молодняка крупного рогатого скота, которые приводят к нарушению функций желудочно-кишечного тракта, бронхопневмонии, что, в свою очередь, ведет к снижению неспецифической резистентности и иммунодефицитным состояниям организма животных [1–3]. Высокая заболеваемость и гибель телят в первые дни жизни объясняется прежде всего отсутствием у них развитой системы регуляции их жизненно важных функций, несовершенством пищеварительной системы и иммунной защиты организма [4, 5]. Выходом из создавшейся ситуации является разработка комплексных эффективных протоколов, способных не только оптимизировать работу иммунной системы, но и оказывать положительное воздействие на организм в целом, активизировать обменные процессы, гомеостаз, рост и развитие новорожденных телят [6, 7]. В настоящее время медицинской и ветеринарной науке известно довольно большое количество природных и синтетических фармакологических средств для стимуляции иммуногенеза и общей резистентности организма животных. Однако ограниченное их применение в ветеринарной практике свидетельствует о том, что еще не найдено достаточно эффективных и простых способов фармакологического влияния на иммунный статус животного [8]. Поддержание на высоком уровне защитно-приспособительных механизмов организма животных к воздействию негативных факторов окружающей среды в критические периоды раннего постнатального периода остается актуальной проблемой. Создание новых и усовершенствование существующих схем применения поливалентной сыворотки в сочетании с иммуномодуляторами позволит оптимизировать протоколы их использования в производственных условиях.

Цель исследования – изучить влияние сочетанного применения поливалентной сыворотки и иммуномодулирующих препаратов на заболеваемость, сохранность, резистентность телят в ранний постнатальный период выращивания.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние комбинированного введения поливалентной сыворотки и иммуномодуляторов на

динамику морфобиохимических, иммунологических показателей крови телят.

2. Определить оптимальное сочетание, кратность введения поливалентной сыворотки и иммуномодуляторов для повышения общей резистентности организма, сохранности телят в ранний постнатальный период выращивания.

3. Определить экономическую эффективность применения поливалентной сыворотки и иммуномодуляторов в ранний постнатальный период выращивания телят.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Научно-производственный опыт по изучению сочетанного использования поливалентной сыворотки против пастереллеза, сальмонеллеза, эшерихиоза, парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота (ФКП «Армавирская биофабрика», Россия) и иммуномодуляторов «Фоспренил» (ЗАО «Микро-Плюс», Россия), «Миксоферон» (АО «Мосагроген», Россия), «Иммунофан» (ООО НПП «БИОНОКС», Россия), «Риботан» (ООО фирма «НПВиЗЦ «ВЕТЗВЕРОЦЕНТР», Россия) провели в одном из хозяйств Алтайского края. Для этого сформировали контрольную (К-1) и 5 опытных (О-1–О-5) групп телят симментальской породы, содержащих не менее 5 особей в каждой. Животным контрольной группы однократно внутримышечно в первый день жизни вводили поливалентную сыворотку в дозе 20,0 мл. Телятам опытных групп – сыворотку и иммуномодуляторы по схеме, представленной в таблице 1. Животные находились в одинаковых условиях содержания и имели одинаковый рацион.

Оценку эффективности сочетанного использования иммуномодуляторов и поливалентной сыворотки проводили по следующим методикам: определение общего количества эритроцитов, лейкоцитов, содержание гемоглобина – общепринятыми методами [9]; биохимические исследования сыворотки крови: содержание общего белка – рефрактометрически (ИРФ-22), фракций белка – нефелометрическим методом [10]; бактерицидную и лизоцимную активность сыворотки крови (БАСК, ЛАСК) – фотонейлометрическим методом [11]; количество метгемоглобина в крови – колориметрическим методом [12]; общее количество иммуноглобулина класса G – методом иммуоферментного анализа с использованием соответствующего набора;

Таблица 1

Схема сочетанного введения телятам поливалентной сыворотки против ассоциированных инфекций крупного рогатого скота и иммуномодуляторов

Table 1

Scheme of joint administration of polyvalent serum against associated bovine infections and immunomodulators to calves

Группа	Количество, гол.	Кратность / интервал между введениями, дней	Препарат, мл				
			сыворотка поливалентная	«Риботан»	«Миксоферон», доз	«Фоспренил»	«Иммунофан»
К-1	9	1	20,0	–	–	–	–
О-1	5	1	20,0	1,0	–	–	–
О-2	5	2/14	20,0	–	–	2,5	–
О-3	5	2/14	20,0	–	5	–	–
О-4	5	2/7	20,0	–	–	2,5	1,0
О-5	5	2/7	20,0	–	–	–	1,0

фагоцитарную активность нейтрофилов крови – по методу А. И. Иванова и Б. А. Чухловина [13] с использованием тест-культуры *Escherichia coli* O111, выращенной в течение суток на мясопептонном агаре; содержание Т- и В-лимфоцитов в периферической крови определяли методом спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана Е-РОК и эритроцитами мыши по С. В. Бурцевой и О. Ю. Рудишину [14]; экономическую эффективность рассчитывали по методике, предложенной Ю. Е. Шатохиным и соавт. [15].

Забор крови проводили перед инъекциями сыворотки и иммуномодуляторов и через 10 дней после окончания введения препаратов.

Все процедуры, выполненные с участием животных, соответствовали этическим стандартам, принятым Европейской конвенцией ETS № 123.

Достоверность средних значений оценивали методом вариационной статистики по критерию Стьюдента – Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При определении фоновых показателей крови новорожденных телят до введения сыворотки и иммуномодуляторов в первый день жизни установили, что общее количество белка сыворотки крови было ниже допустимой нормы [16] на 17,3%, альфа-глобулиновой фракции – на 19,1%, IgG отсутствовал у 40,0% подопытных животных (табл. 2).

При исследовании крови телят по завершении опыта отмечали достоверное снижение общего количества белка в контрольной группе на 28,0% ($P < 0,05$) по сравнению с исходными показателями. Достоверное увеличение данного показателя по сравнению с контролем регистрировали у телят в группах О-1–О-5 при одновременном уменьшении в пределах физиологической нормы альбуминовой фракции в сыворотке крови телят всех опытных групп, кроме О-3. Положительную динамику нормализации уровня альфа-глобулиновой фракции в сыворотке крови отмечали у всех под-

Таблица 2

Содержание общего белка и его фракций в сыворотке крови подопытных телят

Table 2

Total protein and its fractions in the sera of experimental calves

Группа	Общее количество белка, г/л	Альбумины, %	Глобулины, %			Общее количество IgG, Ед/мл	Соотношение альбумин/глобулин, ед.
			α	β	γ		
норма	60–85	33–50	12–20	10–16	25–40	< 10	0,83–1,19
исходные показатели крови							
	49,6 ± 3,93	42,6 ± 6,65	9,7 ± 2,10	16,1 ± 3,89	30,7 ± 7,90	4,0 ± 2,51	0,72 ± 0,163
через 10 дней							
К-1	35,7 ± 1,49*	46,9 ± 5,74	11,2 ± 1,57	16,0 ± 3,96	25,3 ± 2,32	2,6 ± 0,94	0,73 ± 0,090
О-1	64,2 ± 4,72**(*)	35,7 ± 1,50	11,7 ± 1,86	17,0 ± 0,94	17,0 ± 0,94(*)	1,6 ± 0,52	0,55 ± 0,040
О-2	44,5 ± 0,98(*)	44,4 ± 0,94	16,7 ± 0,39*	12,9 ± 1,33	17,0 ± 0,94(*)	2,1 ± 1,01	0,83 ± 0,058
О-3	47,0 ± 1,70(*)	47,0 ± 1,82	13,8 ± 1,17	13,4 ± 1,59	15,1 ± 0,41(*)	8,8 ± 1,77(**)	0,89 ± 0,060
О-4	57,8 ± 1,49(*)	35,6 ± 4,51	11,5 ± 2,36	14,5 ± 1,52	31,0 ± 0,42(**)	5,3 ± 2,14	0,51 ± 0,030
О-5	49,7 ± 0,41(*)	41,8 ± 3,53	12,9 ± 1,77	16,9 ± 2,13	28,3 ± 4,48	3,5 ± 2,32	0,73 ± 0,101

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ – к исходным значениям (to the initial values);

(*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$ – к контролю (to control).

опытных телят с достоверным увеличением в группе О-2 ($P < 0,05$). Снижение содержания гамма-глобулиновой фракции в сравнении с контрольной группой выявили у телят в группах О-1–О-3 ($P < 0,05$), у животных в группах О-4 и О-5 регистрировали увеличение данного показателя соответственно на 22,5% ($P < 0,01$) и 11,8%. Повышение общего количества иммуноглобулинов класса G в 2,2 раза и на 32,5% в сравнении с исходными данными отмечали в сыворотке крови телят групп О-3 и О-4 соответственно, при этом IgG присутствовал в крови у 100,0% обследованных животных. Максимальное увеличение общего количества IgG по отношению к контрольным животным фиксировали у телят группы О-3 – в 3,4 раза, в группе О-4 – в 2 раза, в группе О-5 – на 34,6%, уменьшение IgG отмечали в крови телят в группах О-1 и О-2 на 38,4 и 19,2% соответственно. Альбумин-глобулиновое соотношение находилось в пределах физиологической нормы лишь в группах О-2 и О-3.

Гематологический профиль телят, участвующих в опыте, представлен в таблице 3. Анализируя исходные показатели крови телят, установили, что общее количество эритроцитов и лейкоцитов находилось в пределах референсного диапазона, при этом общее количество гемоглобина было ниже нормы на 21,8%, цветового показателя – на 2,8%. У подопытных телят регистрировали превышение референсных границ по метгемоглобину в 4 раза, БАСК – на 18,9%, снижение уровня ЛАСК – на 79,2%.

После завершения опыта установили достоверное увеличение по сравнению с контролем общего количества эритроцитов в крови телят группы О-1 на 20,8% ($P < 0,05$), группы О-2 – на 3,9%, группы О-4 – на 9,1%, группы О-5 – на 5,2%. Отмечено достоверное повышение общего количества гемоглобина по отношению к исходным данным и результатам исследований крови контрольных телят на 14,6% в группе О-1 ($P < 0,01$) и на 35,8% ($P \leq 0,05$) в группе О-3.

Понижение общего количества метгемоглобина с достоверной разницей регистрировали у телят в группах О-3–О-5 ($P < 0,05$), что указывает на снижение тканевой гипоксии за счет уменьшения окисленного трехвалентного железа в крови опытных животных. Лейкоциты находились в границах референтных значений. Цветовой показатель крови в сравнении с контрольной группой телят возрос на 15,5% в группе О-3 и уменьшился на 1,4–14,1% в группах О-1, О-2, О-4, О-5. Рост БАСК отмечали в группе О-1 на 21,9% ($P < 0,01$), в группах О-3 – на 35,0%, О-4 – на 33,2%, О-5 – на 11,4% по отношению к контролю. Значение ЛАСК во всех опытных группах достоверно превосходило в 2,2–3,2 раза ($P \leq 0,05$) данный показатель телят контрольной группы.

Результаты оценки функционального состояния иммунной системы телят подопытных групп представлены в таблице 4. Рост пролиферативной активности Т-лимфоцитов с достоверным отличием ($P \leq 0,05$; $P \leq 0,01$) по отношению к исходным значениям регистрировали у всех животных: в группе К-1 данный показатель увеличился на 17,7%, в опытных – на 22,8–29,9%. Содержание В-лимфоцитов достоверно отличалось лишь в группах О-1 и О-4 ($P \leq 0,05$). Фагоцитарная активность нейтрофилов повысилась в контрольной группе на 11,9%, в опытных – на 14,6–21,8% ($P \leq 0,05$) в сравнении с исходными показателями. В крови подопытных телят без достоверных различий установили повышение фагоцитарного числа на 15,4–30,8%.

Сочетанное введение новорожденным телятам сыворотки с «Риботаном» (О-1), сыворотки с «Фоспренилом» и «Иммунофаном» (О-4) позволило добиться 100,0%-й сохранности животных в данных группах, что на 22,3% выше, чем в контрольной группе (К-1), на 20,0% – в сравнении с группами О-2, О-3 и О-5, где дополнительно с сывороткой вводили «Фоспренил», «Миксоферон» и «Иммунофан» соответственно (рис. 1).

Таблица 3

Гематологические показатели крови подопытных телят до и после инъекций иммуномодуляторов в сочетании с поливалентной сывороткой

Table 3

Hematological parameters observed in experimental calves before and after administration of immunomodulators together with polyvalent serum

Группа	Эритроциты, $10^9/\text{л}$	Гемоглобин, г/л	Метгемоглобин, %	Лейкоциты, $10^{12}/\text{л}$	Цветовой показатель, ед.	БАСК, %	ЛАСК, %
норма	5,0–7,5	99–129	0–5	4,5–12,0	0,7–1,1	23–28	25–33
исходные показатели крови							
–	$6,7 \pm 0,80$	$77,4 \pm 6,13$	$20,0 \pm 0,62$	$5,5 \pm 1,21$	$0,68 \pm 0,10$	$33,3 \pm 9,86$	$5,2 \pm 0,37$
показатели крови по окончании опыта через 14 дней							
К-1	$7,7 \pm 0,64$	$79,0 \pm 3,09$	$18,1 \pm 0,91$	$5,4 \pm 0,42$	$0,71 \pm 0,06$	$34,3 \pm 4,47$	$6,7 \pm 1,45$
О-1	$9,3 \pm 0,47^{(*)}$	$90,5 \pm 2,33^{(**)}$	0	$5,4 \pm 0,54$	$0,62 \pm 0,06$	$41,8 \pm 1,6^{**}$	$21,2 \pm 3,10^{(*)}$
О-2	$8,0 \pm 0,04$	$82,5 \pm 2,89$	$19,7 \pm 0,22$	$7,5 \pm 0,47^{(*)}$	$0,61 \pm 0,01$	$34,3 \pm 4,29$	$15,5 \pm 1,36^*$
О-3	$7,7 \pm 0,44$	$107,3 \pm 6,42^{(*)}$	$13,5 \pm 0,6^{(*)}$	$6,5 \pm 0,65$	$0,82 \pm 0,03$	$46,3 \pm 6,95$	$20,8 \pm 0,88^{(*)}$
О-4	$8,4 \pm 0,75$	$85,5 \pm 4,28$	$13,1 \pm 0,75^{(*)}$	$5,8 \pm 0,28$	$0,70 \pm 0,09$	$45,7 \pm 6,82$	$20,2 \pm 0,95^{(*)}$
О-5	$8,1 \pm 0,50$	$88,7 \pm 3,75$	$17,7 \pm 0,28^*$	$6,8 \pm 1,01$	$0,65 \pm 0,06$	$38,2 \pm 4,50$	$14,9 \pm 0,26^{(*)}$

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ – к исходным значениям (to the initial values);

(*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$ – к контролю (to control).

Таблица 4

Показатели функциональной активности клеток крови телят до и после сочетанного введения иммуномодуляторов с поливалентной сывороткой

Table 4

Functional activity of blood cells in calves before and after combined administration of immunomodulators with polyvalent serum

Группа	В-лимфоциты, %	Т-лимфоциты, %	Фагоцитарная активность, %	Фагоцитарное число, %
исходные показатели	11,2 ± 1,48	25,4 ± 0,35	55,4 ± 1,56	1,3 ± 0,13
показатели крови по окончании опыта через 14 дней				
К-1	15,6 ± 2,43	29,9 ± 2,65*	62,0 ± 2,22	1,5 ± 0,16
О-1	20,4 ± 2,50*	33,0 ± 1,75*	67,5 ± 2,26*	1,6 ± 0,14
О-2	16,6 ± 2,13	32,8 ± 2,21*	65,1 ± 1,96*	1,5 ± 0,12
О-3	17,8 ± 2,48	31,2 ± 1,32*	64,2 ± 1,26*	1,6 ± 0,13
О-4	17,8 ± 1,72*	32,2 ± 1,28**	65,3 ± 2,48*	1,7 ± 0,15
О-5	16,4 ± 2,55	32,0 ± 2,21*	63,5 ± 2,35*	1,5 ± 0,21

* P ≤ 0,05, ** P ≤ 0,01.

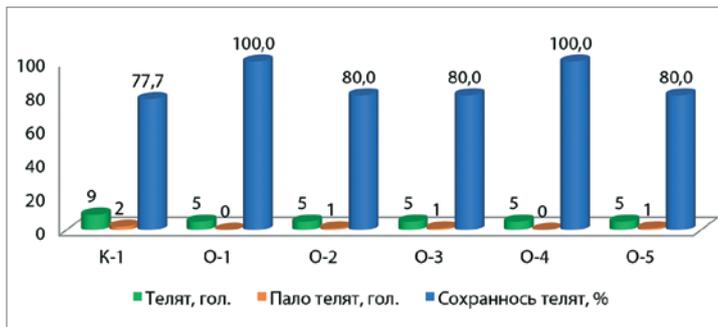


Рис. 1. Сохранность телят после инъекций иммуномодуляторов и поливалентной сыворотки

Fig. 1. Calves survived after joint administration of immunomodulators and polyvalent serum

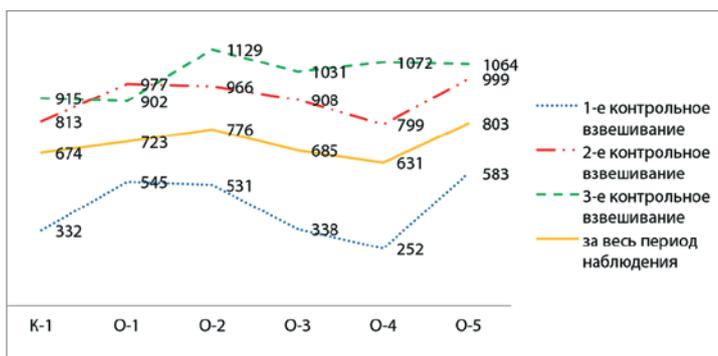


Рис. 2. Абсолютный прирост массы тела в граммах

Fig. 2. Absolute weight gain in grams

Заболелаемость телят в контрольной группе составила 100,0%, в группах О-1 и О-4 – по 20,0%, в О-2 и О-5 – по 40,0%, а в группе О-3 – 60,0%, в среднем по опытным группам – 36,0%.

Как видно из представленных на рисунке 2 данных, абсолютный прирост живой массы телят при 1-м контрольном взвешивании увеличился на 64,2% в груп-

пе О-1, на 59,9% – в группе О-2, на 1,8% – в группе О-3 и на 75,6% – в группе О-5, в группе О-4 отмечали снижение данного показателя на 24,1% по сравнению с контролем (К-1). За весь 3-месячный период наблюдений данная тенденция сохранялась, максимальное увеличение живой массы на 19,1% получили в группе О-5, на 1,6–15,1% – в группах О-1–О-3, снижение на 6,4% регистрировали в группе О-4 в сравнении с телятами контрольной группы.

Экономическую эффективность комбинированного применения иммуномодуляторов и поливалентной сыворотки против бактериальных и вирусных инфекций для повышения неспецифической резистентности организма телят в ранний постнатальный период рассматривали как разницу между вероятным (потенциально возможным) и фактическим экономическим ущербом, предотвращенным в хозяйстве. Расчеты проводили на основании данных, полученных в ходе проведения научно-производственного опыта.

Ущерб от падежа телят определяли по формуле:

$$Y_1 = M \times (Cп + Вп \times T \times Ц) - Cф,$$

где М – количество павших животных; Сп – стоимость приплода при рождении, руб., Сп = 3,61 × Цз, где 3,61 – количество молока (ц), которое можно получить за счет кормов, расходуемых на формирование плода; Цз – закупочная цена одного центнера молока базисной жирности (руб.): Сп = 3,61 × 2900 = 10 469,00 руб.; Вп – среднесуточный прирост живой массы молодняка сельскохозяйственных животных, кг; Т – возраст павшего животного, сут; Ц – цена реализации единицы продукции, руб.; Сф – денежная выручка от реализации продуктов убоя, руб.

$$Y_1 (K-1) = 2 \times (10469,00 + 0,333 \times 7 \times 175) - 380 = 21\,373,85 \text{ руб.}$$

$$Y_1 (O-2) = 1 \times (10469,00 + 0,531 \times 3 \times 175) - 180 = 10\,567,78 \text{ руб.}$$

$$Y_1 (O-3) = 1 \times (10469,00 + 0,338 \times 7 \times 175) - 175 = 10\,708,05 \text{ руб.}$$

$$Y_1 (O-5) = 1 \times (10469,00 + 0,583 \times 4 \times 175) - 165 = 10\,712,10 \text{ руб.}$$

$$Y_1 (O-1, O-4) = 0 \text{ руб.}$$

Определение ущерба от снижения продуктивности телят:

$$Y_2 = Mз \times (Вз - Вб) \times T \times Ц,$$

где Мз – количество заболевших животных, гол.; Вз и Вб – среднесуточная продуктивность здоровых и больных животных, кг; Т – средняя продолжительность наблюдения за изменением продуктивности животных, дни; Ц – цена реализации единицы продукции, руб.

$$Y_2 (K-1) = 9 \times (0,332 - 0,213) \times 4,5 \times 175 = 843,41 \text{ руб.}$$

$$Y_2 (O-1) = 1 \times (0,545 - 0,429) \times 3,5 \times 175 = 71,05 \text{ руб.}$$

$$Y_2 (O-2) = 2 \times (0,531 - 0,492) \times 4 \times 175 = 54,60 \text{ руб.}$$

$$Y_2 (O-3) = 3 \times (0,338 - 0,251) \times 5 \times 175 = 228,38 \text{ руб.}$$

$$Y_2 (O-4) = 1 \times (0,252 - 0,215) \times 4 \times 175 = 25,90 \text{ руб.}$$

$$Y_2 (O-5) = 2 \times (0,583 - 0,432) \times 4 \times 175 = 211,40 \text{ руб.}$$

Общий ущерб и ущерб на 1 голову, руб.: Y = Y1 + Y2.

$$Y (K-1) = 21\,373,85 + 843,41 = 22\,217,26 / 9 = 2468,58 \text{ руб.}$$

$$Y (O-1) = 0 + 71,05 = 71,05 / 5 = 14,21 \text{ руб.}$$

$$Y (O-2) = 10\,567,78 + 54,60 = 10\,622,38 / 5 = 2124,48 \text{ руб.}$$

$$Y (O-3) = 10\,708,05 + 228,38 = 10\,936,43 / 5 = 2187,29 \text{ руб.}$$

$$Y (O-4) = 0 + 25,90 = 25,90 / 5 = 5,18 \text{ руб.}$$

$$Y (O-5) = 10\,712,10 + 211,40 = 10\,923,50 / 5 = 2184,70 \text{ руб.}$$

Затраты на обработку одного животного, руб.:
 К-1 = 20,00 руб., О-1 = 99,90 руб., О-2 = 54,05 руб.,
 О-3 = 51,75 руб., О-4 = 70,82 руб., О-5 = 87,60 руб.

Экономическая эффективность обработки одного животного:

$$Эк = (Сб + Уб) - (Сн + Ун),$$

где Сб и Сн – текущие производственные затраты на ветеринарные мероприятия соответственно в базовом и новом вариантах в расчете на одно обработанное животное, руб.; Уб и Ун – удельный экономический ущерб на единицу работы соответственно в базовом и новом вариантах, руб.

$$Эк (О-1) = (0 + 2187,88) - (99,90 + 14,21) = 2073,77 \text{ руб.}$$

$$Эк (О-2) = (0 + 2187,88) - (54,05 + 2124,48) = 9,35 \text{ руб.}$$

$$Эк (О-3) = (0 + 2187,88) - (51,75 + 2187,29) = -51,16 \text{ руб.}$$

$$Эк (О-4) = (0 + 2187,88) - (70,82 + 5,18) = 2111,88 \text{ руб.}$$

$$Эк (О-5) = (0 + 2187,88) - (87,60 + 2184,70) = -84,42 \text{ руб.}$$

Экономический эффект от проведения профилактических мероприятий на рубль затрат рассчитывали по формуле:

$$Ээ = Эк / Зв,$$

где Эк – экономическая эффективность обработки одного животного; Зв – ветеринарные затраты на одно животное, руб.

$$О-1 = 2073,77 / 99,90 = 20,76 \text{ руб.}$$

$$О-2 = 9,35 / 54,05 = 0,17 \text{ руб.}$$

$$О-3 = -51,16 / 51,75 = -0,99 \text{ руб.}$$

$$О-4 = 2111,88 / 70,82 = 29,82 \text{ руб.}$$

$$О-5 = -84,42 / 87,60 = -0,96 \text{ руб.}$$

Экономический эффект от проведения профилактических мероприятий на рубль затрат в опытных группах составил от 0,17 руб. в группе О-2, до 29,82 руб. в группе О-4, отрицательные значения получены в группах О-3 и О-5.

Как показали результаты изучения влияния сочетанного применения поливалентной сыворотки и иммуномодуляторов, хорошо себя зарекомендовал «Риботан» в комбинации с сывороткой (О-1), введенные однократно в первый день жизни телят. На втором месте по эффективности следующая схема – двукратное введение через 7 дней поливалентной сыворотки с чередованием «Фоспренила» и «Иммунофана» (О-4), способствующих активации иммунной системы организма телят, что подтверждается достоверным увеличением содержания Т- и В-лимфоцитов, повышением фагоцитарной активности нейтрофилов. Необходимо отметить, что инъекции новорожденным телятам поливалентной сыворотки в сочетании с иммуностимуляторами позволяет снизить заболеваемость телят на 70,0%, добиться 100,0%-й сохранности, улучшив данный показатель на 22,3% по сравнению с контролем. В связи с этим при прочих равных условиях применения поливалентной сыворотки в сочетании с иммуномодуляторами предпочтение необходимо отдавать препаратам, способным не только нормализовать работу иммунной системы, но и оказывать комплексное положительное воздействие на гомеостаз в целом, стимулировать рост и развитие молодняка на ранних этапах онтогенеза.

ВЫВОДЫ

1. Однократное внутримышечное введение новорожденным телятам поливалентной сыворотки в дозе 20,0 мл в сочетании с подкожной инъекцией «Риботана» в дозе 1,0 мл способствует нормализации морфобиохимических показателей крови с достоверным увеличением общего количества гемоглобина, эритроцитов, белка в сыворотке крови, гамма-глобулиновой фракции, Т- и В-лимфоцитов, фагоцитарной активности нейтрофилов, лизоцимной и бактерицидной активности сыворотки крови в ранний постнатальный период выращивания.

2. Использование поливалентной сыворотки в той же дозе двукратно при смене введения 2,5 мл «Фоспренила» через 7 дней на «Иммунофан» в дозе 1,0 мл приводит к достоверному снижению метгемоглобина в крови телят, повышению общего количества белка, гамма-глобулинов, Т- и В-лимфоцитов, фагоцитарной лизоцимной активности крови в сравнении с телятами контрольной группы и исходными показателями крови.

3. Указанные схемы дают возможность снизить заболеваемость телят в раннем онтогенезе на 70,0%, добиться сокращения летальности на 22,3%.

4. Экономическая эффективность ветеринарных мероприятий в результате использования вышеназванных протоколов для повышения уровня неспецифической резистентности организма телят в ранний постнатальный период выращивания в среднем составляет 25,29 руб. на 1 руб. затрат.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Семенов В. Г., Никитин Д. А., Петрянкин Ф. П., Герасимова Н. И. Применение комплексных иммунотерапевтических препаратов серии ПС при выращивании телят. *Фундаментальные исследования*. 2015; 2 (21): 4671–4675. EDN: TWSZJV.
- Бобер Ю. Н., Воронов Д. В., Долгий А. А., Харитонов А. П. Болезни молодняка: учебно-методическое пособие. Гродно: ГТАУ; 2013. 89 с.
- Козицына А. И. Применение «Элитокса» для нормализации обменных процессов коров-матерей и повышение резистентности телят: дис. ... канд. вет. наук. СПб.; 2018. 179 с.
- Петрянкин Ф. П., Петрова О. Ю. Болезни молодняка животных. 2-е изд., перераб. и доп. СПб.: Лань; 2014. 351 с.
- Шахов А. Г. Достижения и основные направления исследований по изучению болезней молодняка сельскохозяйственных животных. *Практик*. 2010; 2: 26–33. EDN: VCCEHX.
- Хаитов Р. М. Иммунология. 2-е изд., испр. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013. 528 с.
- Санин А. В., Савойская С. Л., Кожевникова Т. Н., Санина В. Ю., Сосновская О. Ю. Повышение сохранности, роста, развития и неспецифической резистентности телят с помощью современных иммуномодулирующих средств. *Ветеринария Кубани*. 2019; 2: 11–14. DOI: 10.33861/2071-8020-2019-2-11-14.
- Петрянкин Ф. П. Иммунотропные препараты для лечения и профилактики болезней животных. *Ветеринарная патология*. 2009; 2 (29): 98–105. EDN: OCZFFN.
- Кудрявцев А. А., Кудрявцева Л. А. Клиническая гематология животных. М.: Колос; 1974. 399 с.
- Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: справочник. Под ред. проф. И. П. Кондрахина. М.: Колос; 2004. 520 с.
- Гугушвили Н. Н. Иммунологические методы исследования в ветеринарии (методические рекомендации): утв. Департаментом ветеринарии МСХ РФ № 13-7-2/2128. Краснодар: КубГАУ; 2001; 50–53.
- Методические указания по диагностике, профилактике и лечению отравлений сельскохозяйственных животных нитратами и нитритами: утв. ГУВ при Совете Министров СССР от 28.03.1991. Режим доступа: <https://base.garant.ru/71104036>.
- Иванов А. И., Чухловин Б. А. К методике определения поглотительной способности нейтрофилов. *Лабораторное дело*. 1967; 10: 610–613.
- Бурцева С. В., Рудишин О. Ю. Современные биологические и биохимические методы исследований в зоотехнии: учебное пособие. Барнаул: АГАУ; 2014; 161–170.

15. Шатохин Ю. Е., Никитин И. Н., Чулков П. А., Воскобойник В. Ф. Методика определения экономической эффективности ветеринарных мероприятий. М.: МГАВМиБ им. К. И. Скрябина; 1997. 36 с.

16. Васильева С. В., Конопатов Ю. В. Клиническая биохимия крупного рогатого скота: учебное пособие. 2-е изд., испр. СПб.: Лань; 2017. 185 с.

REFERENCES

1. Semenov V. G., Nikitin D. A., Petryankin F. P., Gerasimova N. I. Application of complex immunotherapeutic preparations of the PS series at cultivation of calves. *Fundamental research*. 2015; 2 (21): 4671–4675. EDN: TWSZJV. (in Russ.)

2. Bober Yu. N., Voronov D. V., Dolgiy A. A., Kharitonov A. P. Diseases of young animals: a manual. Grodno: GSAU; 2013. 89 p. (in Russ.)

3. Kozitsina A. I. Use of "Elitox" to normalize metabolic processes in mother cows and increase resistance in calves: Thesis for degree of Candidate of Science (Veterinary Medicine). Saint Petersburg; 2018. 179 p. (in Russ.)

4. Petryankin F. P., Petrova O. Yu. Diseases of young animals. 2nd ed., revised and supplemented. Saint Petersburg: Lan'; 2014. 351 p. (in Russ.)

5. Shakhov A. G. Dostizheniya i osnovnye napravleniya issledovaniy po izucheniyu boleznei molodnyaka sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh = Achievements and main goals of research in diseases of young farm animals. *Praktik*. 2010; 2: 26–33. EDN: VCCEHX. (in Russ.)

6. Khaïtov R. M. Immunology. 2th ed., corrected and supplemented. Moscow: GEOTAR-Media; 2013. 528 p. (in Russ.)

7. Sanin A. V., Savoyskaya S. L., Kozhevnikova T. N., Sanina V. Yu., Sosnovskaya O. Yu. Safety, growth, development and non-specific resistance increasing of calves with help of modern immunomodulatory preparations. *Veterinaria Kubani*. 2019; 2: 11–14. DOI: 10.33861/2071-8020-2019-2-11-14. (in Russ.)

8. Petryankin F. P. Immunotropnye preparations for treatment and preventive maintenance of illnesses of animals. *Veterinarnaya patologiya*. 2009; 2 (29): 98–105. EDN: OCZFFN. (in Russ.)

9. Kudryavtsev A. A., Kudryavtseva L. A. Clinical hematology of animals. Moscow: Kolos; 1974. 399 p. (in Russ.)

10. Methods of clinical diagnosis used in veterinary laboratories: reference book. Ed. by prof. I. P. Kondrakhin. Moscow: KolosS; 2004. 520 p. (in Russ.)

11. Gugushvili N. N. Immunological tests used in veterinary medicine: a guidance approved by Department of Veterinary Medicine of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation No. 13-7-2/2128. Krasnodar: KubSAU; 2001; 50–53. (in Russ.)

12. Guidance on diagnosis, prevention and treatment of nitrate and nitrite poisoning in farm animals: approved by GUV under the Council of Ministers of the USSR dated 28.03.1991. Available at: <https://base.garant.ru/71104036>. (in Russ.)

13. Ivanov A. I., Chukhlov B. A. K metodike opredeleniya poglotitel'noi sposobnosti neutrofilov = On the method of determining the ingestive and digestive capability of neutrophils. *Laboratornoe delo*. 1967; 10: 610–613. PMID: 4181349. (in Russ.)

14. Burtseva S. V., Rudishin O. Yu. Biological and biochemical research methods currently used in zootechnics: a textbook. Barnaul: ASAU; 2014; 161–170. (in Russ.)

15. Shatokhin Yu. E., Nikitin I. N., Chulkov P. A., Voskoboynik V. F. Cost-effectiveness analysis of veterinary measures. Moscow: Moscow SAVMB; 1997. 36 p. (in Russ.)

16. Vasil'eva S. V., Konopatov Yu. V. Clinical biochemistry of cattle: a textbook. 2th ed., corrected. Saint Petersburg: Lan'; 2017. 185 p. (in Russ.)

Поступила в редакцию / Received 10.05.2023

Поступила после рецензирования / Revised 06.06.2023

Принята к публикации / Accepted 22.06.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ / INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Шаньшин Николай Васильевич, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории разведения и болезней животных ВНИИПО – отдела ФГБНУ ФАНЦА, г. Барнаул, Алтайский край, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-3261-2410>, e-mail: shanshin_2012@rambler.ru.

Nikolay V. Shanshin, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Animal Breeding and Diseases, All-Russian Research Institute of Antler Reindeer Breeding – Department of the Federal Altai Scientific Center for Agrobiotechnologies, Barnaul, Altai Krai, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-3261-2410>, e-mail: shanshin_2012@rambler.ru.



К функциональной морфологии органов пищеварения новорожденных телят и патогенезу эшерихиоза

С. М. Сулейманов

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I» (ФГБОУ ВО Воронежский ГАУ), г. Воронеж, Россия

РЕЗЮМЕ

Несмотря на многочисленные исследования, проблема эшерихиоза новорожденных телят по-прежнему остается одной из актуальных в связи с широким распространением заболевания и высокой смертностью молодняка. В данной статье приводятся результаты экспериментальных исследований, выполненных в ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии». Целью работы было проведение с помощью современных методов комплексных морфологических исследований для более глубокого понимания вопросов этиологии и патогенеза эшерихиозов. Для этого от 28 телят в возрасте 1–10 сут с установленным диагнозом «колибактериоз» был отобран патологический материал в начальной стадии заболевания, при наличии выраженных клинических признаков и в терминальной стадии болезни. Контролем служил материал от 6 клинически здоровых телят аналогичного возраста. Установлено, что в начальной стадии развития эшерихиоза у новорожденных телят ранние структурные изменения обнаруживались в ультраструктуре клеток слизистой оболочки сычуга и тонкого кишечника, а также в паренхиме печени и слабые – в экзокринной части поджелудочной железы. Наиболее глубокие морфофункциональные изменения наблюдались в органах пищеварения при выраженных клинических признаках заболевания. В этот период развития болезни диапазон патологических процессов расширялся с охватом структурной организации сычуга, тонкого и толстого кишечника, печени и поджелудочной железы. В терминальной стадии эшерихиоза глубокие воспалительные процессы развивались не только в органах пищеварения, но и в других системах организма больных телят. Изменения структуры в органах пищеварения в начальной стадии носили альтеративный характер, тогда как при клинически выраженных признаках болезни они проявлялись в виде катарально-некротического воспаления со множественными кровоизлияниями в желудочно-кишечном тракте и паренхиматозных органах. В формировании клинико-морфологической картины в начальной стадии развития эшерихиоза у телят ведущее место принадлежало патологии органов пищеварения. В период становления болезни в организме телят развивались изменения на молекулярном и субклеточном уровнях, которые выявлялись гистохимическими и ультраструктурными исследованиями.

Ключевые слова: телята, эшерихиоз, органы пищеварения, сычуг, кишечник, печень, поджелудочная железа, гистоструктура, гистохимия, ультраструктура, морфометрия

Благодарности: Автор выражает благодарность сотрудникам ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии».

Для цитирования: Сулейманов С. М. К функциональной морфологии органов пищеварения новорожденных телят и патогенезу эшерихиоза. *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (3): 253–258. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-253-258.

Конфликт интересов: Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Сулейманов Сулейман Мухитдинович, доктор ветеринарных наук, профессор, профессор кафедры акушерства, анатомии и хирургии ФГБОУ ВО Воронежский ГАУ, 394087, Россия, г. Воронеж, ул. Мичурина, 1, e-mail: suleimanov@list.ru.

Functional morphology of digestive organs of newborn calves and pathogenesis of escherichiosis

S. M. Suleymanov

Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great (VSAU), Voronezh, Russia

SUMMARY

Despite numerous studies, the problem of escherichiosis in newborn calves remains one of the most urgent due to the extensive spread of the disease and high mortality of young animals. This paper presents results of experimental studies carried out at the FSBSI "All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy". The aim of the work was to conduct complex morphological studies using modern methods for a deeper understanding of escherichiosis etiology and pathogenesis. For that, pathological samples were collected from 28 1–10 day-old calves diagnosed with colibacteriosis at the initial disease stage, demonstrating pronounced clinical signs and having the terminal stage of the disease. Samples from 6 clinically healthy calves of a similar age were used as control. It was found that newborn calves at the initial stage of escherichiosis demonstrated early structural changes in the ultrastructure of mucosa cells of the rennet and small intestine, as well as in the liver parenchyma, and mild changes – in the exocrine part of the pancreas. The most profound morphofunctional changes were observed in digestive organs with apparent clinical signs of the disease. As the condition developed, the range of pathological processes expanded and involved the structural organization of the rennet, small and large intestines, liver and pancreas. At the terminal stage of escherichiosis, deep inflammatory processes occurred not only in digestive organs, but also in other systems of diseased calves. Structural changes in digestive organs had an alterative nature at the initial disease stage, whereas in case of clinically pronounced disease signs there were manifestations of catarrhal-necrotic inflammation with multiple hemorrhages

in the gastrointestinal tract and parenchymal organs. Digestive organ pathology plays the leading role in formation of the clinical and morphological picture at the initial stage of escherichiosis in calves. As the disease developed, the calves demonstrated changes at molecular and subcellular levels that were detected using histochemical and ultrastructural tests.

Keywords: calves, escherichiosis, digestive organs, rennet, intestine, liver, pancreas, histostructure, histochemistry, ultrastructure, morphometry

Acknowledgements: The author expresses gratitude to the staff of the FSBSI "All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy".

For citation: Suleymanov S. M. Functional morphology of digestive organs of newborn calves and pathogenesis of escherichiosis. *Veterinary Science Today*. 2023; 12 (3): 253–258. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-253-258.

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

For correspondence: Suleiman M. Suleymanov, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Professor of the Department of Obstetrics, Anatomy and Surgery, VSAU, 394087, Russia, Voronezh, ul. Michurina, 1, e-mail: suleimanov@list.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Эшерихиоз имеет широкое распространение среди новорожденных телят. Возникновение инфекции зависит не только от наличия в хозяйстве восприимчивых телят, но и от ряда других факторов, таких как гиподинамия, содержание взрослых животных с молодняком в одном помещении, несоблюдение принципов содержания «все пусто, все занято» и др. В отдельных хозяйствах неблагополучие бывает настолько значительным, что переболевает фактически весь рождающийся молодняк, а падеж достигает 5–30% и более [1–9]. Эшерихиозы известны в литературе как диспепсия, токсическая диспепсия, диарейный синдром инфекционной этиологии (*Escherichia coli*), или колибактериоз. Эти заболевания наносят большой экономический ущерб животноводству. Развитие целого ряда патологических состояний, встречающихся только в период новорожденности, обуславливается не только возрастными анатомо-физиологическими и иммунобиологическими особенностями организма новорожденных телят, но и воздействием на них новых условий внешней среды [1, 4–6, 8, 10–16].

Несмотря на многочисленные исследования по изучению этиологической роли *E. coli* в развитии эшерихиоза телят и внедрение массовых вакцинаций, заболевание по-прежнему остается актуальным [17–20]. Оценивая достижения науки в изучении проблемы болезней молодняка, можно считать, что учеными были раскрыты многие особенности этиологии и патогенеза эшерихиозов новорожденных телят, а также предложены производству научно-обоснованные рекомендации борьбы с ними, использование которых дает возможность значительно сократить потери молодняка крупного рогатого скота. Однако в целом проблема борьбы с заболеваемостью молодняка крупного рогатого скота, особенно молозивного периода, далеко не разрешена. Серьезным недостатком является то, что до сих пор не создана научная теория, удовлетворительно объясняющая закономерности возникновения и механизмы развития патологии молодого организма [9, 21–23]. Хотя этиологические факторы массовых эшерихиозов новорожденных телят многообразны, прежде всего они связаны с активизацией условно-патогенной микрофлоры, нарушением зооигиенических норм содержания и кормления [1, 8, 10, 12], а также со снижением резистентности организма молодняка. В настоящее

время удельный вес эшерихиозов новорожденных телят в отдельных хозяйствах Воронежской области (ООО «Воронежпищепродукт») составляет 54% [13].

В связи с этим целью работы было проведение комплексных морфологических исследований для более глубокого понимания вопросов этиологии и патогенеза эшерихиозов новорожденных телят.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии» (ФГБНУ «ВНИВИПФит», г. Воронеж). От 28 телят в возрасте 1–10 сут с установленным диагнозом «эшерихиоз» был отобран патологический материал в начальной стадии заболевания, при наличии выраженных клинических признаков и в терминальной стадии болезни. Контролем служил материал от 6 клинически здоровых телят соответствующего возраста.

Все манипуляции с животными выполняли в соответствии с Европейской конвенцией ETS № 123.

Образцы органов пищеварения для световой микроскопии фиксировались в 10,0–12,0%-м растворе нейтрального формалина, в жидкостях Карнуа и Россмана, а для электронной микроскопии – в 2,5%-м глицерин-альдегиде с постфиксацией в 1,0%-м растворе тетраоксида осмия. Свежие образцы органов замораживались в криостате при –20 °С для изучения активности ферментов. Образцы заливались в парафин и эпон-812 с последующим приготовлением соответствующих срезов для световой и электронной микроскопии.

Для обзорной информации срезы окрашивались гематоксилин-эозином и гематоксилин-пикрофуксин-ом. Гистохимическими методами выявлялись: липиды – суданом 3 + 4 и суданом черным; гемосидерин – по Перлсу; слизь – муцикармином Мейера; комплекс Гольджи – по Эльфману; нейтральные мукополисахариды и гликоген – ШИК-реакцией по Шабадашу и Бауэру; кислые мукополисахариды – альциановым синим; рибонуклеопротеиды (РНП) – галлоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарссону; РНК – по Браше; ДНК – по Фельгену – Розенбеку; активность щелочной фосфатазы – по Грокку – Пирсу с применением диазониевых солей; кислой фосфатазы – по Гомори в модификации Барка; эстеразы – по Нахласу – Зелигману; сукцинатдегидрогеназы – тетразолиевым методом по Нахласу и др.

На однолучевом цитофотометре определялась оптическая плотность гистохимических препаратов с соблюдением стандартности их изготовления на всех этапах обработки. С помощью окулярного микрометра МОВ-1-15* (АО «ЛОМО», Россия) измерялся объем ядер гепатоцитов, высота каемчатого эпителия ворсин и толщина слизистой оболочки.

Ультраструктурометрически изучались гепатоциты, энтероциты и секреторные эпителии экзокринной части поджелудочной железы. Для этой цели случайным образом отбирались электронограммы, не менее 30 фотонегативов с увеличением 6100x от каждой группы животных. Измерение доли объемов цитоплазматических органоидов производилось по основному правилу стереологии [24] с помощью морфометрической сетки [25, 26]. Сетка с 36 узлами укреплялась на экране аппарата для чтения микрофильмов типа 5ПО-1. При этом на площадь фотонегатива размером 6,5 × 9 см приходилось более 100 узлов. Подсчитывалось число узлов, приходящихся на гранулярную и агранулярную эндоплазматические сети, митохондрии, липиды и гиалоплазму. После усреднения данных для каждого органоида вычислялся объем органоидов в процентах от объема цитоплазмы. Доверительные интервалы средних вычислялись для уровня достоверности 0,95.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Начальная стадия эшерихиоза. В этой стадии развития болезни у новорожденных телят ранние структурные изменения обнаруживались в ультраструктуре клеток слизистой оболочки сычуга и тонкого кишечника, а также в паренхиме печени и слабые – в экзокринной части поджелудочной железы.

В сычуге слизистая оболочка была набухшей, с дистрофическими изменениями эпителия, а подслизистая основа ее содержала расширенные капилляры с кровью. Здесь же наблюдалось неравномерное увеличение и деполимеризация ШИК-позитивного материала и кислых мукополисахаридов. В области донных желез сычуга несколько уменьшалась активность сукцинатдегидрогеназы. В собственной пластинке слизистой оболочки обнаруживались единичные тучные клетки в состоянии дистрофии. В ультраструктуре цилиндрического эпителия происходила дистрофия секреторных гранул и мембран эндоплазматической сети с низкой активностью неспецифической эстеразы карбоновых кислот (рис. 1).

В тонкой кишке, преимущественно тощей, на слизистой оболочке наблюдался десквамативный катар каемчатого эпителия ворсин с понижением в них активности щелочной фосфатазы, сукцинатдегидрогеназы и неспецифической эстеразы карбоновых кислот. В то же время повышалась активность кислой фосфатазы, участвующей в лизисе продуктов распада клеток в условиях дистрофии. В ультраструктуре энтероцитов ворсин наблюдалась вакуолизация цитоплазмы, увеличение в них числа лизосом и набухание митохондрий.

В собственной пластинке ворсинок слизистой оболочки выявлялись в небольшом количестве лимфоциты, гистиоциты и тучные клетки. На щеточной каемке энтероцитов многие микроворсинки фрагментировались и содержали умеренную активность неспецифической эстеразы карбоновых кислот, сукцинатдегидрогеназы и высокую – кислой фосфатазы.

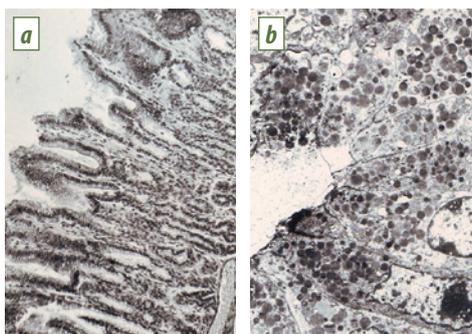


Рис. 1. Структурная организация слизистой оболочки сычуга в начальной стадии развития эшерихиоза у телят: а) пилорические железы у 2-суточного теленка в состоянии дистрофии; б) дистрофия секреторных гранул в эпителиях фундальных желез. Окр. гематоксилин-эозином (а); ув. ок. 8, об. 10 (а), 6100x (б)

Fig. 1. Structure of rennet mucosa at the initial stage of escherichiosis in calves: а) pyloric glands of a 2-day-old calf in a state of dystrophy; б) degeneration of secretory granules in fundic gland epithelium. Staining with hematoxylin-eosin (а); 8x ocular magnification; 10x objective magnification (а); 6,100x (b)

Уменьшалось количество РНП в криптах, значительно – в клетках ворсин. Увеличивалось число полиморфных митохондрий с просветленным матриксом. Гранулярная эндоплазматическая сеть фрагментировалась, общий объем ее составлял 17,7%, а количество агранулярной эндоплазматической сети увеличивалось до 47,0%. Лизосомы обнаруживались повсеместно. Ядра энтероцитов становились гиперхромными. В целом выявлялась низкая секреторная активность энтероцитов в начальной стадии развития эшерихиоза (рис. 2).

В печени выявлялось умеренное количество гликогена, отмечались слабовыраженная жировая

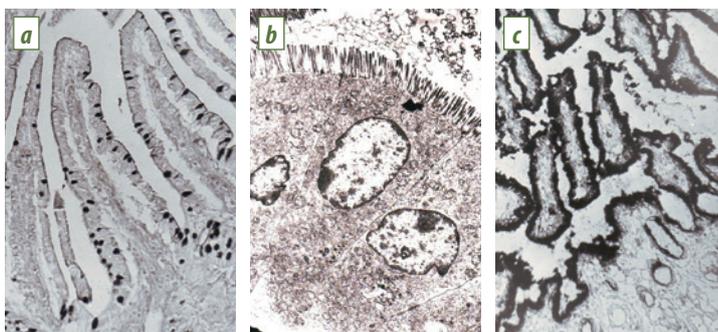


Рис. 2. Гистохимические и ультраструктурные изменения в слизистой оболочке тонкой кишки в начальной стадии развития эшерихиоза у телят: а) дегрануляция кислых мукополисахаридов в бокаловидных клетках 12-перстной кишки; б) вакуолизация цитоплазмы и фрагментация микроворсинок энтероцитов; в) неравномерность активности сукцинатдегидрогеназы в тощей кишке. Окр. альциановым синим (а), азосочетание по Грокку – Пирсу (с); ув. ок. 8, об. 10 (а, с), 6100x (б)

Fig. 2. Histochemical and ultrastructural changes in small intestine mucosa at the initial stage of escherichiosis in calves: а) degranulation of acid mucopolysaccharides in duodenum goblet cells; б) cytoplasm vacuolization and enterocyte microvilli fragmentation; в) irregular activity of succinate dehydrogenase in jejunum. Staining with alcian blue (а); azo-coupling according to Grokk – Pierce (с); 8x ocular magnification; 10x objective magnification (а, с); 6,100x (b)

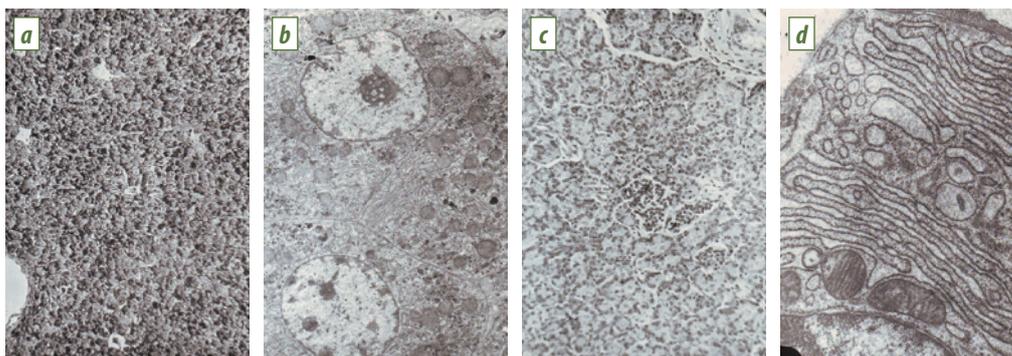


Рис. 3. Гистохимические и ультраструктурные изменения в начальной стадии развития эшерихиоза у телят: а) умеренное количество гликогена в печени; б) вакуолизация цитоплазмы гепатоцитов; в) дистрофия ацинусов экзокринных желез поджелудочной железы; д) вакуолизация ацинарной клетки. Окр. ШИК-реакция (а), гематоксилин-эозином (с); ув. ок. 8, об. 10 (а, с), 6100× (б), 20 000× (д)

Fig. 3. Histochemical and ultrastructural changes at the initial stage of escherichiosis in calves: а) a moderate amount of glycogen in the liver; б) hepatocyte cytoplasm vacuolization; в) dystrophy of exocrine pancreatic gland acini; д) vacuolization of the acinar cell. Periodic-acid-Schiff (PAS) staining (а); hematoxylin-eosin staining (с); 8× ocular magnification; 10× objective magnification (а, с); 6,100× (б); 20,000× (д)

и зернистая дистрофии гепатоцитов и снижение активности сукцинатдегидрогеназы и неспецифической эстеразы карбоновых кислот. Электронно-микроскопические исследования показали, что происходило уменьшение количества гранул гликогена в цитоплазме клеток печени. Содержание гранулярной эндоплазматической сети в гепатоцитах снижалось до 3,4% против 18,0% в норме. При этом каналцы эндоплазматической сети фрагментировались и превращались в крупные вакуоли. Мембраны теряли рибосомы. Появлялись автофагирующие вакуоли. Одновременно отмечалось нарастание липидных включений, контактирующих с митохондриями и мембранами эндоплазматической сети.

В поджелудочной железе в начальной стадии развития эшерихиоза у телят изменений не наблюдалось, но заметно уменьшался объем гранулярной эндоплазматической сети и митохондрий в ацинарных клетках, который составлял 10,0 и 5,0% соответственно (рис. 3).

При выраженных клинических признаках эшерихиоза наиболее глубокие морфофункциональные изменения наблюдались в органах пищеварения. В этот период развития болезни диапазон патологических процессов расширялся с охватом структурной организации сычуга, тонкого и толстого кишечника, печени и поджелудочной железы.

В слизистой оболочке сычуга имелись очаги десквамации и некробиоза эпителиальных клеток верхушки фундальных и пилорических желез с резким уменьшением здесь количества нейтральных и кислых мукополисахаридов, нуклеопротеидного комплекса и снижением активности сукцинатдегидрогеназы и неспецифической эстеразы карбоновых кислот. Отмечались инъецированность кровеносных сосудов и отечность подслизистого слоя. Это приводило к набуханию слизистой оболочки сычуга, ее толщина достигала в среднем 406,1 мкм.

В тонком кишечнике в большинстве случаев наблюдалось оголение верхушки ворсин, кровенаполнение и отек собственной пластинки. Резко снижалась активность щелочной фосфатазы, сукцинатдегидрогеназы и неспецифической эстеразы карбоновых кислот при наличии повышенной активности кислой фос-

фатазы в зоне каемчатого эпителия ворсин. Дистрофические изменения энтероцитов сопровождались значительным уменьшением в них нуклеопротеидов, преимущественно в верхушечной части ворсин. В ультраструктуре многих клеток ворсин выявлялся лизис органоидов цитоплазмы с пикнозом ядер. Просветлялась апикальная часть терминального слоя. На месте микроворсинок клеток находились пучки миофибрилл, а в цитоплазме появлялись миелиновые фигуры и поврежденные митохондрии.

В печени наблюдалось разрушение балочной структуры, а гепатоциты находились в состоянии некробиоза. В ультраструктуре гепатоцитов развивался устойчивый жировой некробиоз, значительно уменьшалось количество гранул гликогена, лизировались мембраны эндоплазматической сети и митохондрий.

В поджелудочной железе значительно страдали ацинарные клетки, в которых происходила вакуолизация цитоплазмы с лизисом гранул зимогена (рис. 4).

Терминальная стадия эшерихиоза. На этой стадии глубокие воспалительные процессы развивались не только в органах пищеварения, но и в других системах организма больных телят.

В дальнейшем, как правило, прогрессировали первоначальные повреждения в органах пищеварения, поскольку наславалась условно-патогенная микрофлора в желудочно-кишечном тракте. Они характеризовались наличием глубоких изменений в структурной организации клеток и тканей с вовлечением в патологический процесс толстого кишечника и поджелудочной железы. Происходило значительное уменьшение активности гидролитических ферментов и содержания мукополисахаридных соединений в желудочно-кишечном тракте и печени. В ультраструктуре клеток слизистой оболочки сычуга, тонкой кишки и печени наблюдалось глубокое повреждение мембранных структур, появление миелиновых фигур, отмечался цитолиз и кариолизис. В гепатоцитах накапливалось большое количество липидных включений. В терминальной стадии эшерихиоза микробная интоксикация вызывала необратимые патологические процессы в органах пищеварения у больных телят, что в большинстве случаев завершалось их гибелью.

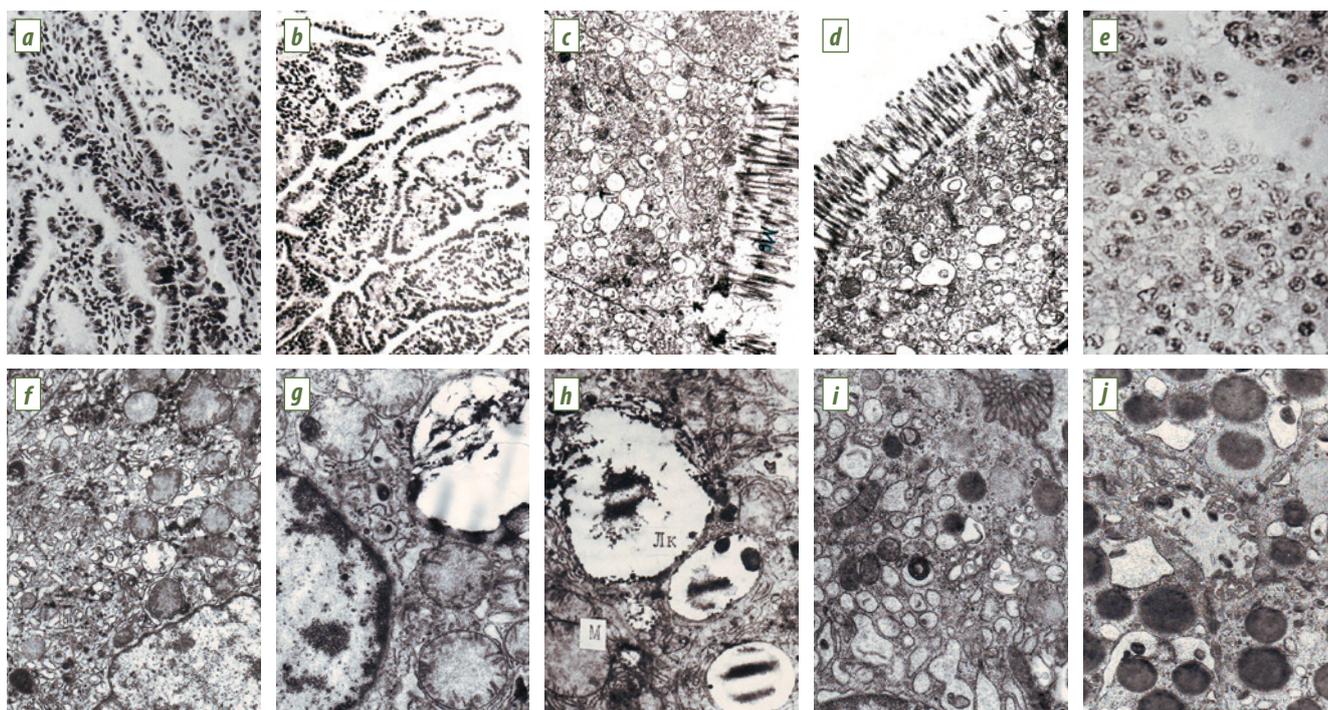


Рис. 4. Структурные изменения в органах пищеварения у телят при выраженных клинических признаках эшерихиоза: а) десквамативный катар каемчатого эпителия тонкой кишки; б) воспалительно-некротический энтерит; в) лизис органоидов цитоплазмы энтероцита; д) некробиоз энтероцита с лизисом микроворсинок; е) разрушение балочной структуры с глубокими некробиотическими изменениями в печени; ф) уменьшение гранул гликогена в цитоплазме гепатоцита с началом развития дистрофических изменений; г) начало жировой дистрофии в гепатоците; h) прогрессирование жирового некробиоза гепатоцита; и) вакуолизация и отсутствие гранул зимогена в цитоплазме ацинарной клетки поджелудочной железы; j) лизис микроворсинок ацинарных клеток поджелудочной железы с некробиозом гранул зимогена. Окр. гематоксилин-эозином (а, б, е); ув. ок. 8, об. 10 (а, б, е), 6100× (с, d, f), 10 000× (g, h, i, j)

Fig. 4. Structural changes in digestive organs of calves with pronounced clinical signs of escherichiosis: a) desquamative catarrh of the small intestine border epithelium; b) inflammatory-necrotic enteritis; c) lysis of enterocyte cytoplasmic organelles; d) enterocyte necrobiosis and microvilli lysis; e) destruction of the columnar structure with deep necrobiotic changes in the liver; f) reduction of glycogen granules in hepatocyte cytoplasm and onset of dystrophic changes; g) onset of hepatocyte fatty degeneration; h) progression of hepatocyte fatty necrobiosis; i) vacuolization and absence of zymogen granules in pancreatic acinar cell cytoplasm; j) lysis of microvilli of pancreatic acinar cells and necrobiosis of zymogen granules. Staining with hematoxylin-eosin (a, b, e); 8× ocular magnification; 10× objective magnification (a, b, e); 6,100× (c, d, f); 10,000× (g, h, i, j)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как в начальной стадии, так и при клинически выраженных признаках эшерихиоза у телят в патологический процесс на структурно-функциональном уровне вовлекались органы пищеварения. Однако по глубине изменений и их обратимости они имели свои особенности. Изменения структуры в органах пищеварения в начальной стадии носили альтеративный характер, тогда как при клинически выраженных признаках эшерихиоза они проявлялись в виде катарально-некротического воспаления со множественными кровоизлияниями в желудочно-кишечном тракте и паренхиматозных органах.

При заболевании новорожденных телят эшерихиозом развивающиеся морфологические изменения соответствовали общепатологическим процессам. Вместе с тем развивался комплекс морфологических изменений, характерный для данной патологии. В формировании клинко-морфологической картины в начальной стадии развития эшерихиоза у телят ведущее место принадлежало патологии органов пищеварения. В период становления болезни в организме телят развивались изменения на молекулярном и субклеточном уровнях, которые выявлялись гистохимическими и ультраструктурными исследованиями.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анохин Б. М., Сулейманов С. М. Органы пищеварения при диспепсии новорожденных телят. *Ветеринария*. 1977; 5: 82–87. EDN: VNSNP.
2. Джупина С. И. Этиология и профилактика массовых желудочно-кишечных болезней телят. *Ветеринарная патология*. 2003; 2: 28–30. EDN: HSOBLX.
3. Зароза В. Г., Бутова Г. А., Бутов В. Г. Возбудители колибактериоза животных и их лабораторная идентификация. *Ветеринария сельскохозяйственных животных*. 2008; 3: 29–33.
4. Коляков Я. Е. Колибактериоз телят. *Ветеринария*. 1978; 4: 48–53. PMID: 349859.
5. Макаров В. В. О проблеме причинности инфекционных заболеваний. *Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук*. 2003; 5: 11–14. EDN: DMITSK.
6. Цион Р. А. Дифференциальная диагностика диспепсии, колибактериоза и паратифа телят. *Ветеринария*. 1966; 5: 50–53. PMID: 4975345.
7. Чернуха В. К., Пустовар Я. П. Клинико-патоморфологические изменения при токсической диспепсии телят. *Ветеринария*. 1965; 8: 104–111.
8. Шаймухаметов М. А. Эпизоотология и лечебно-профилактические мероприятия при эшерихиозе телят в Республике Башкортостан: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Уфа; 2019. 20 с. EDN: NJMMYS.
9. Шишков В. П. Патоморфологическая диагностика токсической диспепсии телят. *Ветеринария*. 1964; 4: 64–66.
10. Аликаев В. А. Успехи и проблемы науки и практики в борьбе с болезнями молодняка. *Ветеринария*. 1967; 11: 73–77. PMID: 5630024.
11. Иванов А. В., Матросова Л. Е., Тремасова А. М., Титова В. Ю. Изучение терапевтической эффективности пробиотика Энтероспорин при колибактериозе телят. *Ветеринарная медицина*. 2011; 95: 201–202. EDN: SMUKSV.

12. Митюшин В. В. Диспепсия новорожденных телят. М.: Россельхозиздат, 1979. 111 с.
13. Сулейманов С. М. Применение Редиара при желудочно-кишечной патологии у новорожденных телят в ООО «Воронежпшхепродукт». *Ветеринарно-санитарные аспекты качества и безопасности сельскохозяйственной продукции: материалы III Международной конференции по ветеринарно-санитарной экспертизе (15 ноября 2018 г.)*. Воронеж: ФГБОУ ВО Воронежский ГАУ; 2019; 4: 204–206. EDN: EQRFBM.
14. Шахов А. Г., Масыанов Ю. Н., Сашнина Л. Ю., Золотарев А. И. Иммунный статус телят при диарейном синдроме инфекционной этиологии. *Ветеринарная патология*. 2010; 1: 35–39. EDN: OBMNEF.
15. Zufarov K. A., Shishova E. K., Tashhodjaev P. I., Baibekov I. M. Электронно-микроскопическое исследование эпителия слизистой толстой кишки после резекции тощей. *Архив патологии*. 1970; 32 (4): 57–62. PMID: 5459109.
16. Сулейманов С. М. Морфологические изменения при диспепсии телят. *Ветеринария*. 1976; 9: 69–71. PMID: 997244.
17. Zufarov K. A., Baibekov I. M., Khodzhimetov A. A. Компенсаторно-приспособительные процессы в кишечнике. М: Медицина; 1974. 208 с.
18. Жукова С. В., Панина Т. А., Востроилова Г. А., Ермакова Т. И. Анти-микробная активность и эффективность комплексного препарата ФК-1 при колибактериозе телят. *Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана*. 2012; 211: 71–75. EDN: PCAQZV.
19. Сулейманов С. М. Морфофункциональная зависимость органов пищеварения и коры надпочечников при диспепсии телят. *Ветеринария*. 1978; 3: 91–94. EDN: JMZRVD.
20. Gebregiorgis A., Tessema T. S. Characterization of *Escherichia coli* isolated from calf diarrhea in and around Kombolcha, South Wollo, Amhara Region, Ethiopia. *Trop. Anim. Health Prod.* 2016; 48 (2): 273–281. DOI: 10.1007/s11250-015-0946-9.
21. Порохов Ф. Ф. О профилактике болезней молодняка. *Ветеринария*. 1974; 11: 97–100. PMID: 4456757.
22. Шишков В. П. Гистохимические исследования при диспепсии новорожденных телят. *Ветеринария*. 1966; 4: 78–79. PMID: 6010634.
23. Ильин П. А. Морфофункциональная дифференциация тканей органов ротоглотки, пищевода и многокамерного желудка крупного рогатого скота в онтогенезе: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Омск; 1972. 43 с.
24. Салтыков С. А. Стереометрическая металлография. 3-е изд., перераб. и доп. М.: Металлургия; 1970. 375 с.
25. Автандилов Г. Г. Морфометрия в патологии. М.: Медицина; 1973. 230 с.
26. Weibel E. R. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. In: *International Review of Cytology*. Ed. by G. H. Bourne, J. F. Danielli. Vol. 26. New York, London: Academic Press; 1969; 235–302. DOI: 10.1016/s0074-7696(08)61637-x.
1. Anokhin B. M., Suleymanov S. M. Digestive organs in dyspepsia in newborn. *Veterinariya*. 1977; 5: 82–87. EDN: VNSEN. (in Russ.)
2. Dzhupina S. I. Etiologiya i profilaktika massovykh zheludochno-kishechnykh boleznei telyat = Etiology and prevention of mass gastrointestinal diseases of calves. *Veterinary Pathology*. 2003; 2: 28–30. EDN: HSOBLX. (in Russ.)
3. Zaroza V. G., Burova G. A., Burov V. G. Vozbuditeli kolibakterioza zhi-votnykh i ikh laboratornaya identifikatsiya = Colibacillosis pathogens in animals and their laboratory identification. *Veterinariya sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh*. 2008; 3: 29–33. (in Russ.)
4. Koliakov Ia. E. Colibacillosis in calves. *Veterinariya*. 1978; 4: 48–53. PMID: 349859. (in Russ.)
5. Makarov V. V. O probleme prichinnosti infektsionnykh zaboлевanii = Aspects of infectious disease causation. *Vestnik of the Russian agricultural science*. 2003; 5: 11–14. EDN: DMITSK. (in Russ.)
6. Tsion R. A. The differential diagnosis of dyspepsion, colibacteriosis and paratyphoid fever of calves. *Veterinariya*. 1966; 5: 50–53. PMID: 4975345. (in Russ.)
7. Chernukha V. K., Pustovar Ya. P. Kliniko-patomorfologicheskie izmeneniya pri toksicheskoj dispepsii teliat = Clinical and pathomorphological changes in calves with toxic dyspepsia. *Veterinariya*. 1965; 8: 104–111. (in Russ.)
8. Shaimukhametov M. A. Epizootology and therapeutic and preventive measures for escherichiosis of calves in the Republic of Bashkortostan: Author's Abstract of Thesis for degree of Candidate of Science (Biology). Ufa; 2019. 20 p. EDN: NJMMYS. (in Russ.)
9. Shishkov V. P. Pathomorphological diagnosis of toxic dyspepsia of calves. *Veterinariya*. 1964; 4: 64–66. (in Russ.)
10. Alikhaev V. A. Scientific and practical achievements and problems in controlling diseases of young animals. *Veterinariya*. 1967; 11: 73–77. PMID: 5630024. (in Russ.)
11. Ivanov A. V., Matrosova L. Ye., Tremasova A. M., Titova V. Yu. Study of therapeutic efficacy of probiotic Enterosporin at colibacteriosis of calves. *Veterinary Medicine*. 2011; 95: 201–202. EDN: SMUKSV. (in Russ.)
12. Mityushin V. V. Dyspepsia of newborn calves. Moscow: Rossel'khozizdat; 1979. 111 p. (in Russ.)
13. Suleimanov S. M. Primenenie Rediara pri zheludochno-kishechnoi patologii u novorozhdennykh telyat v ООО «Voronezhpishcheprodukt» = Use of Rediar in gastrointestinal pathology in newborn calves in ООО «Voronezhpishcheprodukt». *Veterinarno-sanitarnye aspekty kachestva i bezopasnosti sel'skokhozyaistvennoi produkttsii: materialy III Mezhdunarodnoi konferentsii po veterinarno-sanitarnoi ekspertize (15 noyabrya 2018 g.) = Veterinary and sanitary aspects of agricultural product quality and safety: proceedings of the III International Conference on Veterinary and Sanitary Expertise (November 15, 2018)*. Voronezh: Voronezh SAU; 2019; 4: 204–206. EDN: EQRFBM. (in Russ.)
14. Shachov A. G., Masjanov J. N., Sashnina L. J., Zolotarev A. I. The immune status of calves with diarrhea syndrome of infectious etiology. *Veterinary Pathology*. 2010; 1: 35–39. EDN: OBMNEF. (in Russ.)
15. Zufarov K. A., Shishova E. K., Tashkhodzhaev P. I., Baibekov I. M. Electron microscopic study of mucosa epithelium of the large intestine after resection of the jejunum. *Arkhiv Patologii*. 1970; 32 (4): 57–62. PMID: 5459109. (in Russ.)
16. Suleimanov S. M. Morphological changes in dyspepsia in calves. *Veterinariya*. 1976; 9: 69–71. PMID: 997244. (in Russ.)
17. Zufarov K. A., Baibekov I. M., Khodzhimetov A. A. Compensatory adaptive processes in the intestine. Moscow: Meditsina; 1974. 208 p. (in Russ.)
18. Zhukova S. V., Pанина Т. А., Vostroilova G. A., Ermakova T. I. Antimicrobial activity and clinical efficiency of a new complex antibacterial preparation at colibacteriosis of calves. *Scientific notes Kazan Bauman State Academy of Veterinary Medicine*. 2012; 211: 71–75. EDN: PCAQZV. (in Russ.)
19. Suleimanov S. M. Morphofunctional relationship of the digestive organs and adrenal cortex in dyspepsia in calves. *Veterinariya*. 1978; 3: 91–94. PMID: 644876. (in Russ.)
20. Gebregiorgis A., Tessema T. S. Characterization of *Escherichia coli* isolated from calf diarrhea in and around Kombolcha, South Wollo, Amhara Region, Ethiopia. *Trop. Anim. Health Prod.* 2016; 48 (2): 273–281. DOI: 10.1007/s11250-015-0946-9.
21. Porokhov F. F. Prevention of diseases in young stock. *Veterinariya*. 1974; 11: 97–100. PMID: 4456757. (in Russ.)
22. Shishkov V. P. Histochemical studies of dyspepsia in newborn calves. *Veterinariya*. 1966; 4: 78–79. PMID: 6010634. (in Russ.)
23. Il'in P. A. Morphofunctional differentiation of tissues of oropharynx, esophagus and multichamber stomach of cattle in ontogenesis: Author's Abstract of Thesis for degree of Doctor of Science (Biology). Omsk; 1972. 43 p. (in Russ.)
24. Saltykov S. A. Stereometric metallography. 3rd ed., revised and supplemented. Moscow: Metallurgiya; 1970. 375 p. (in Russ.)
25. Avtandilov G. G. Morphometry in pathology. Moscow: Meditsina; 1973. 230 p. (in Russ.)
26. Weibel E. R. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. In: *International Review of Cytology*. Ed. by G. H. Bourne, J. F. Danielli. Vol. 26. New York, London: Academic Press; 1969; 235–302. DOI: 10.1016/s0074-7696(08)61637-x.

Поступила в редакцию / Received 31.07.2023

Поступила после рецензирования / Revised 09.08.2023

Принята к публикации / Accepted 02.09.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ / INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Сулейманов Сулейман Мухитдинович, доктор ветеринарных наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации, профессор кафедры акушерства, анатомии и хирургии ФГБОУ ВО Воронежский ГАУ, г. Воронеж, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-0461-9885>, e-mail: suleimanov@list.ru.

Suleiman M. Suleymanov, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Professor of the Department of Obstetrics, Anatomy and Surgery, VSAU, Voronezh, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-0461-9885>, e-mail: suleimanov@list.ru.



Филогенетический анализ дерматофитов, выделенных от мелких домашних животных

А. М. Смагулова^{1,2}, Е. В. Кухар¹, Т. И. Глотова², А. Г. Готов²

¹ НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет имени С. Сейфуллина» (НАО «КАТУ им. С. Сейфуллина»), г. Астана, Республика Казахстан

² Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦА РАН (ИЭВСИДВ СФНЦА РАН), р. п. Краснообск, Новосибирская обл., Россия

РЕЗЮМЕ

Дерматофитозы – широко распространенные во всем мире заболевания кожи и ее производных, чаще всего вызываемые грибами родов *Microsporium* и *Trichophyton*. Идентификация вида возбудителя имеет большое эпидемиологическое значение, а также необходима для проведения эффективной терапии. Цель исследований – идентификация и филогенетический анализ дерматофитов, выделенных от собак и кошек на территории Республики Казахстан и Российской Федерации, с помощью молекулярных методов. Видовая принадлежность изолятов грибов была подтверждена секвенированием по двум парам праймеров внутреннего транскрибируемого спейсерного участка (internal transcribed spacer, ITS) рДНК, что позволило депонировать их в базу данных GenBank. На основании результатов секвенирования были идентифицированы *Microsporium canis* (12 штаммов) и *Trichophyton benhamiae* (2 штамма). Проведен анализ нуклеотидных последовательностей и построены филогенетические деревья с учетом результатов идентификации дерматофитов по двум парам праймеров. Построение филогенетического дерева, основанное на отражении родственных связей дерматофитов, показало, что, независимо от использования разных пар праймеров, возбудители рода *Microsporium* и *Trichophyton* во всех случаях достоверно распределены по разным кладам. Анализ структур фрагментов последовательности *ITS4F/ITS5R* позволил выявить генетическое родство штаммов *Trichophyton benhamiae*, впервые выделенных от кошек на территории России, с российским штаммом, изолированным от морской свинки. Сравнительный анализ геномов грибов рода *Microsporium* и *Trichophyton* с референтными штаммами показал относительно невысокий уровень внутривидового полиморфизма и точечных мутаций последовательностей. В результате анализа данных был определен высокий процент гомологии нуклеотидных последовательностей, что позволяет использовать праймеры для проведения полимеразной цепной реакции в качестве диагностического теста при дерматофитозах кошек и собак.

Ключевые слова: дерматофитоз, *Microsporium canis*, *Trichophyton benhamiae*, филогенетическое дерево, гомология, референтный штамм, нуклеотидная последовательность

Благодарности: Работа выполнена в рамках научно-исследовательской темы № 0118РКИ0321 «Биология микроскопических грибов – возбудителей микозов кожи сельскохозяйственных животных» в 2018–2022 гг.

Для цитирования: Смагулова А. М., Кухар Е. В., Глотова Т. И., Готов А. Г. Филогенетический анализ дерматофитов, выделенных от мелких домашних животных. *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (3): 259–264. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-259-264.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Глотова Татьяна Ивановна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории биотехнологии – диагностический центр ИЭВСИДВ СФНЦА РАН, 630501, Россия, Новосибирская обл., Новосибирский район, р. п. Краснообск, e-mail: t-glotova@mail.ru.

Phylogenetic analysis of dermatophytes isolated from small domestic animals

A. M. Smagulova^{1,2}, E. V. Kukhar¹, T. I. Glotova², A. G. Glotov²

¹ NCJSC “S. Seifullin Kazakh Agrotechnical Research University” (“S. Seifullin KATU” NCJSC), Astana, Republic of Kazakhstan

² Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East SFSCA RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk Oblast, Russia

SUMMARY

Dermatophytoses are diseases of skin and its accessory structures that are widely spread worldwide. They are most commonly caused by fungi of the genera *Microsporium* and *Trichophyton*. The identification of the agent's species has a great epidemiological significance and is essential for effective therapy. The aim of the study is the identification and phylogenetic analysis of dermatophytes isolated from dogs and cats in the Republic of Kazakhstan and the Russian Federation by means of molecular techniques. The fungal isolate species were confirmed by sequencing using two rDNA internal transcribed spacer (ITS) primer pairs, and this allowed for their deposition to the GenBank database. Based on the sequencing results, *Microsporium canis* (12 strains) and *Trichophyton benhamiae* (2 strains) were identified. The nucleotide sequences were analysed, and phylogenetic trees were constructed, taking into account the results of the dermatophyte identification using two primer pairs. The constructed phylogenetic trees reflecting the relationships of dermatophytes showed that, irrespective of the primer pairs used, the *Microsporium* and *Trichophyton* pathogens are in all cases reliably assigned to different clades. The analysis of *ITS4F/ITS5R* sequence fragment structures enabled the establishment of genetic relatedness between the *Trichophyton benhamiae* strains first isolated from cats in Russia and the Russian strain recovered from a guinea pig. The comparative analysis of the genomes of the *Microsporium* and *Trichophyton* fungi and reference strains revealed a relatively low level of intraspecies polymorphism and point mutations of the sequences. The data analysis demonstrated a high percentage of nucleotide sequence homology, and this allows using the primers for PCR tests intended for dermatophytosis diagnosis in cats and dogs.

Keywords: dermatophytosis, *Microsporium canis*, *Trichophyton benhamiae*, phylogenetic tree, homology, reference strain, nucleotide sequence

Acknowledgements: The study was conducted within research topic No. 0118RKI0321 "Biology of microfungi – livestock dermatomycosis agents" in 2018–2022.

For citation: Smagulova A. M., Kukhar E. V., Glotova T. I., Glotov A. G. Phylogenetic analysis of dermatophytes isolated from small domestic animals. *Veterinary Science Today*. 2023; 12 (3): 259–264. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-259-264.

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

For correspondence: Tatyana I. Glotova, Doctor of Science (Biology), Professor, Chief Researcher, Laboratory of Biotechnologies – Diagnostic Center, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East SFSCA RAS, 630501, Russia, Novosibirsk Oblast, Novosibirsky District, Krasnoobsk, e-mail: t-glotova@mail.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Дерматофиты – кератинофильные грибы, принадлежащие к семейству *Arthrodermataceae* (*Onygenales*, *Ascomycota*), включающие десятки родственных видов, различающихся в основном по их анаморфам или бесполом формам, объединенные в три классических рода: *Trichophyton*, *Microsporium* и *Epidermophyton* [1]. Роды *Trichophyton* и *Microsporium* включают антропофильные, зоофильные и геофильные виды дерматофитов, которые способны вызывать инфекцию преимущественно у людей или животных, встречаются в почве в качестве свободноживущих обитателей. Род *Epidermophyton* включает в себя лишь один вид – *E. floccosum*, который поражает только человека.

Заболевания, вызываемые этими грибами, – дерматофитозы – распространены по всему миру, число случаев заражения ежегодно увеличивается не только у животных, но и у людей. Особое значение имеет распространение дерматофитозов среди мелких домашних животных – кошек и собак, являющихся компаньонами человека [2–4]. *Microsporium canis* и *Trichophyton mentagrophytes* являются наиболее значимыми видами дерматофитов, выделенных от инфицированных собак, кошек и других плотоядных [5, 6].

До недавнего времени диагностика дерматофитозов основывалась на анализе клинических признаков заболевания, которые ненадежны из-за изменчивого характера дерматологических поражений и сходства с другими кожными заболеваниями, имитирующими симптомы, характерные для дерматофитозов [6]. Прямое микроскопическое исследование проб биологического материала, отобранных из очагов поражений, и изолирование культур дерматофитов на питательных средах являются золотым стандартом диагностики дерматофитозов. Однако в некоторых случаях для видовой идентификации может потребоваться дополнительное изучение биохимических свойств выделенных культур дерматофитов. Поэтому видовая идентификация дерматофитов на основе изучения фенотипических свойств является трудоемким процессом, требующим больших затрат времени и высокой квалификации исследователей [7].

Молекулярные методы являются перспективными для прямого обнаружения ДНК грибов в клинических образцах и их видовой идентификации [8]. В настоящее время методы, основанные на определении нуклеотидной последовательности рибосомальных генов, используются для видовой идентификации дермато-

фитов в некоторых странах [9]. Результаты полностью либо частично секвенированных генов рРНК различных видов микроорганизмов поступают в международные базы данных и могут быть использованы в качестве референтных. Сравнение последовательностей генов и отдельных участков генов, кодирующих рибосомальные РНК, может способствовать выявлению родственных связей между дерматофитами [10]. Применение метода мультилокусного микросателлитного типирования было использовано для изучения путей распространения и передачи *M. canis* в Японии [11]. Результаты изучения распространенности *M. canis* среди кошек, собак и людей с помощью молекулярно-генетического типирования с применением прямого (*ITS1* 5'-TC CGTAGGTGAACCTGCGG-3') и обратного (*ITS4* 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') праймеров показало, что домашние и уличные животные, а также кошки и собаки с симптомами или без симптомов заболевания являются основными источниками дерматофитов для человека [12]. Применение молекулярных методов позволило установить этиологическую структуру дерматофитозов в Иране, которая была представлена следующими видами: *M. canis* – 78,5%, *M. gypsum* – 10,7% и *T. mentagrophytes* – 10,7% [13].

Целью исследований было оценить возможность применения молекулярных методов для идентификации и филогенетического анализа дерматофитов, выделенных от собак и кошек на территории Республики Казахстан и Российской Федерации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись нуклеотидные последовательности 5.8, 18, 28S рРНК межгенной области (internal transcribed spacer, внутренний транскрибируемый спейсер, или *ITS*-область) представителей дерматофитов двух родов: *Microsporium* ($n = 12$) и *Trichophyton* ($n = 2$), выделенных от собак и кошек на территории Республики Казахстан и Российской Федерации (табл.).

Аmplификацию маркерных генов (*ITS*) проводили в конечном реакционном объеме 25 мкл, содержащем 1× Phusion HF-буфер, 2,5 мМ MgCl₂, 1U Phusion ДНК-полимеразу и 200 мкМ dNTP (New England BioLabs Inc., США), 25 пмоль каждого праймера и 20 нг экстрагированной ДНК из одного образца.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили при следующих условиях термоциклирования: предварительная денатурация ДНК при 95 °С в течение 5 мин,

далее 35 циклов при 95 °С в течение 30 с, при 58 °С в течение 40 с, при 72 °С в течение 50 с и окончательная элонгация 5 мин при 72 °С. Амплифицированные продукты ДНК анализировали на горизонтальном электрофорезе в 1,5%-м агарозном геле с использованием 1× TAE буферного раствора и EtBr. Параметры протекания электрофореза – 120 V, 250 мА, 50 W, время реакции – 30 мин. Амплифицированные фрагменты ДНК секвенировали с помощью метода Сэнгера и набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США).

Последовательности праймеров использовали такие же, как и для ПЦР.

Для обеспечения точности результатов амплифицированные фрагменты секвенировали с двумя парами праймеров: *ITS1F* прямой (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) и *ITS4R* обратный (TCCTCCGCTTATTGATATGC) [12]; *ITS4F* прямой (TCCTCCGCTTATTGATATGC) и *ITS5R* обратный (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) [14].

Продукты секвенирования изучали на генетическом анализаторе ABI 3130XL (Applied Biosystems, США). Анализ и редактирование хроматограммы проводили с использованием Sequencing Analysis Software v5.2, Patch 2 (Applied Biosystems, США). Полученные последовательности депонировали в международную базу данных GenBank. Множественное выравнивание полученных последовательностей осуществляли с помощью алгоритмов MUSCLE и ClustalW.

Филогенетический анализ проводили по методу максимального правдоподобия и ближайшего соседа с использованием программы для биоинформационного анализа MEGA (v11).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате секвенирования 12 изолятов рода *Microsporium* и 2 рода *Trichophyton* по Сэнгеру с использованием пары праймеров *ITS1F/ITS4R*, 6 изолятов рода *Microsporium* и 2 штаммов рода *Trichophyton* с помощью пары праймеров *ITS4F/ITS5R* были идентифицированы возбудители дерматофитозов кошек и собак *M. canis* и *T. benhamiae*.

Высокий процент совпадений нуклеотидных последовательностей у анализируемых изолятов с референтными штаммами позволил депонировать их в международную базу данных NCBI. Им были присвоены индивидуальные инвентарные номера при регистрации результатов генотипирования

Таблица
Перечень изолятов дерматофитов, выделенных от собак и кошек

Table
The list of dermatophyte isolates recovered from dogs and cats

№ п/п	Предполагаемый возбудитель	Номер изолята	Дата выделения на питательных средах	Вид животного	Регион
1	<i>Microsporium</i> spp.	5	04.05.2021	кошка	Республика Казахстан
2		8	31.05.2021		
3		22	14.09.2021		
4		27	17.09.2021		
5		29	21.09.2021	кот	
6		33	10.10.2021		
7		35	11.10.2021	кошка	
8		48	28.10.2021		
9		58	21.12.2021		
10		61	25.12.2021	собака	
11		64	25.12.2021		
12	<i>Trichophyton</i> spp.	68	12.01.2022	кошка	Российская Федерация
13	<i>Trichophyton</i> spp.	19	02.12.2021	кошка	
14		20	02.12.2021	кот	

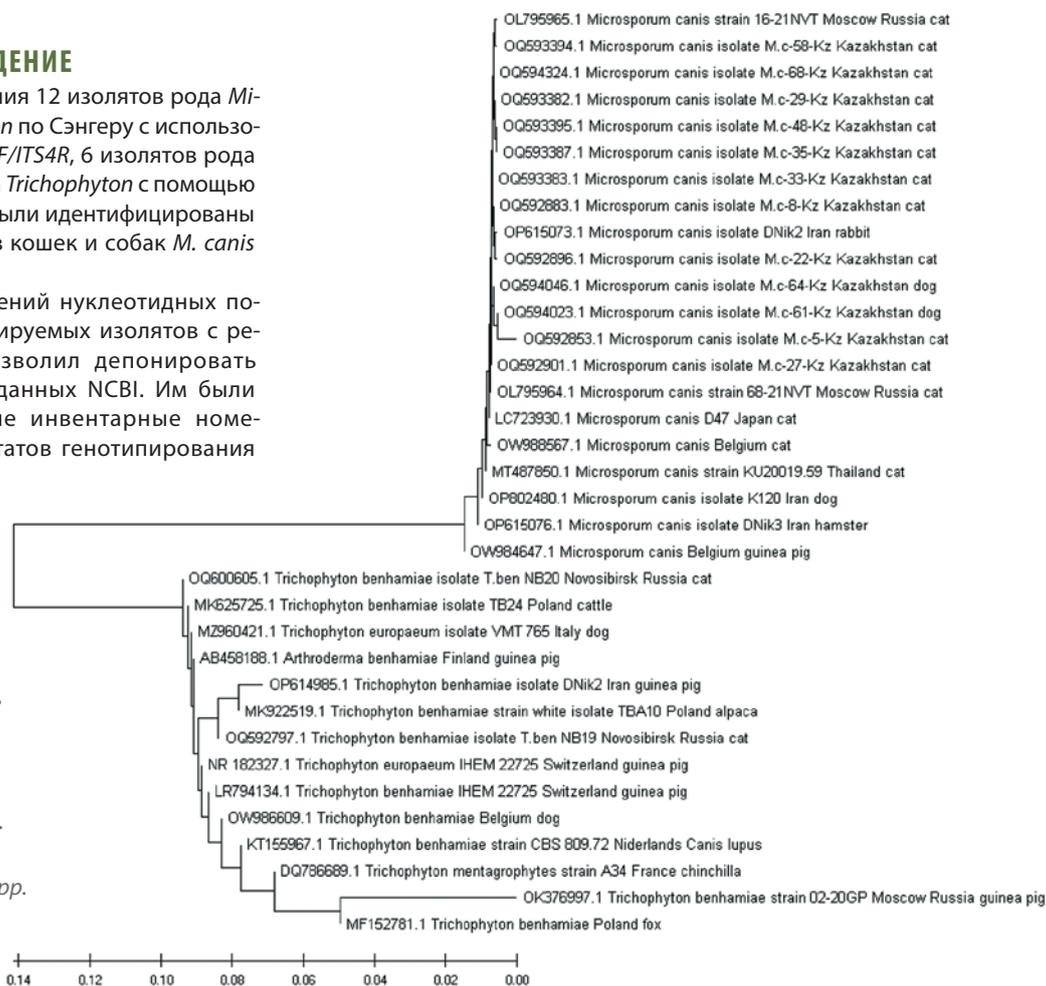


Рис. 1. Филогенетическое дерево, основанное на анализе структур фрагментов последовательности ITS1F/ITS4R, дерматофитов Microsporium и Trichophyton spp.

Fig. 1. Phylogenetic tree of Microsporium and Trichophyton spp. dermatophytes based on ITS1F/ITS4R sequence fragment structure analysis

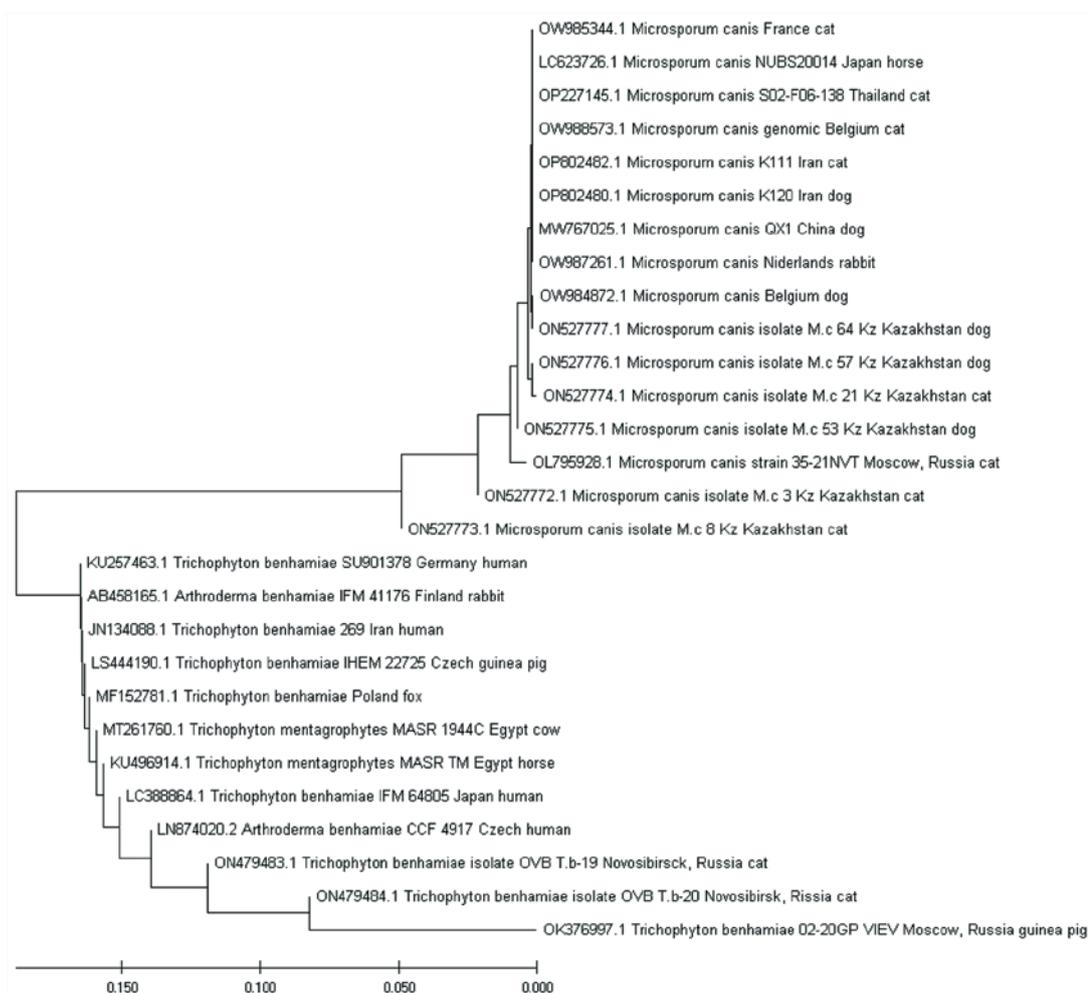


Рис. 2. Филогенетическое дерево, основанное на анализе структур фрагментов последовательности ITS4F/ITS5R, дерматофитов *Microsporium* и *Trichophyton* spp.

Fig. 2. Phylogenetic tree of *Microsporium* and *Trichophyton* spp. dermatophytes based on ITS4F/ITS5R sequence fragment structure analysis

по ITS1F/ITS4R: *M. canis* – OQ592853.1, OQ592883.1, OQ592896.1, OQ592901.1, OQ593382.1, OQ593383.1, OQ593387.1, OQ593395.1, OQ593394.1, OQ594023.1, OQ594046.1, OQ594324.1; *T. benhamiae* – OQ592797.1, OQ600605.1.

При регистрации результатов генотипирования по ITS4F/ITS5R им были присвоены следующие индивидуальные инвентарные номера: *M. canis* – ON527772.1, ON527773.1, ON527774.1, ON527775.1, ON527776.1, ON527777.1; *T. benhamiae* – ON479483.1, ON479484.1.

Для построения филогенетического дерева был проведен поиск типовых представителей дерматофитов родов *Microsporium* и *Trichophyton* по базе данных полных нуклеотидных последовательностей 5.8, 18, 28S рРНК межгенной области для дальнейшего использования их в качестве референтных штаммов для сравнительного филогенетического анализа идентифицированных штаммов.

Эволюционное родство штаммов было выведено с использованием метода Neighbor-joining (объединения соседей) [15]. Филогенетическое дерево построено в масштабе, показывающем эволюционное расстояние, соответствующее 14 заменам на каждые 100 нуклеотидов. Эволюционные расстояния были вычислены с использованием метода максимального составного правдоподобия [16] и выражены в единицах количества

замен оснований на сайт. Все неоднозначные позиции были удалены для каждой пары последовательностей (опция попарного удаления). В итоговом наборе данных было в общей сложности 1419 позиций. Филогенетические деревья, основанные на анализе структур фрагментов последовательности ITS1F/ITS4R и ITS4F/ITS5R, отражающие родственные связи дерматофитов рода *Microsporium* и *Trichophyton*, представлены на рисунках 1 и 2 соответственно.

Отображенный на рисунке 2 оптимальный вариант дерева построен в масштабе, показывающем эволюционное расстояние, соответствующее 15–20 заменам на каждые 100 н. о. Анализ включал 28 нуклеотидных последовательностей. Все неоднозначные позиции были удалены для каждой пары последовательностей (опция попарного удаления). В итоговом наборе данных было в общей сложности 1152 позиции. Эволюционный анализ был проведен с использованием программы для биоинформационного анализа MEGA (v11) [17].

Построение филогенетического дерева, основанное на отражении родственных связей дерматофитов, показало, что, независимо от использования разных пар праймеров, возбудители рода *Microsporium* и *Trichophyton* во всех случаях достоверно распределены по разным кладам. Анализ структур фрагментов последовательности ITS4F/ITS5R позволил установить гене-

тическое родство всех штаммов *T. benhamiae*, впервые изолированных от кошек на территории России, с российским штаммом, выделенным от морской свинки.

Эволюционное родство штаммов, выявленное при анализе данных генома каждого штамма дерматофита, полученных с помощью праймеров *ITS1F/ITS4R*, показано на рисунках 3 и 4.

Для сравнения релевантной последовательности рДНК межгенной области видов *M. canis* были подобраны последовательности из внешней группы исследуемых штаммов.

На рисунке 3 виден высокий уровень гомологии последовательностей 5.8, 18, 28S рДНК межгенной области видов *M. canis*. Последовательности LC723930.1 и MT487850.1 имеют всего по одной нуклеотидной замене, что указывает на точечную мутацию. У OL795964.1 выявлены три мононуклеотидные делеции (т. е. полиморфизм). Наличие всего одной делеции выявлено у OW988567.1, так же как и у последовательности казахстанского штамма OQ594324.1 (отмечено *).

Аналогичными методами провели анализ релевантной последовательности рДНК межгенной области штаммов *T. benhamiae*.

Из представленных на рисунке 4 данных видно, что в последовательности штамма OQ592797.1 (отмечено *) имеются дополнительные нуклеотидные вставки, указывающие на полиморфизм. Второй штамм OQ600605.1 *T. benhamiae* был гомологичен референтным штаммам. Точечные мутации выявлены в последовательностях штаммов OP614985.1, MK922519.1, MK625725.1. Нуклеотидная последовательность штамма OK376997.1 имела две замены, что также свидетельствует о точечных мутациях.

Эволюционное родство штаммов, выявленное при анализе данных генома каждого штамма дерматофита, полученных с помощью праймеров *ITS4F/ITS5R*, показано на рисунках 5 и 6.

Для сравнения релевантной последовательности рДНК межгенной области штаммов *M. canis* были подобраны последовательности из внешней группы исследуемых штаммов.

На рисунке 5 видно, что девять из одиннадцати представленных последовательностей имеют единственный случай полиморфизма, одна последовательность имеет мутацию. Анализируемая последовательность (отмечено *) имеет три нуклеотидные замены.

Сравнительный анализ релевантных последовательностей рДНК межгенной области штаммов вида *T. benhamiae* с помощью праймеров *ITS4F/ITS5R* представлен на рисунке 6.

Как видим, все нуклеотидные последовательности штаммов *T. benhamiae* гомологичны. Последовательности трех штаммов MT261760.1, KU496914.1 и OK376997.1 имеют по одной мутации в каждой. Две нуклеотидные делеции выявлены у штаммов *T. mentagrophytes* MT261760.1 и KU496914.1. Данные штаммы находятся в одном кладе, не являются представителями вида *T. benhamiae*, что достоверно повышает специфичность диагностического теста и позволяет дифференцировать представителей двух видов одного рода.

Штамм OK376997.1 является представителем вида *T. benhamiae*, изолированным от морской свинки. В сравнении с анализируемыми штаммами *T. benhamiae*, выделенными от кошек, его нуклеотидные последовательности имеют одно отличие в виде точечной мутации.

OL795965.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCGAAGCTCTT
OL795964.1	GAA-CTGCGGAAGGATCA-TAACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGG-CCCCGAAGCTCTT
LC723930.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCGAAGCTCTT
MT487850.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCGAAGCTCTT
MT534183.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCGAAGCTCTT
OP615073.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCGAAGCTCTT
OP615076.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCGAAGCTCTT
OP802480.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCGAAGCTCTT
OW988464.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCGAAGCTCTT
OW988567.1	GAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGC-AGAGGTCGAAGTTGGCCCCGAAGCTCTT
OQ594324.1*	GAA-CTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCGAAGCTCTT

Рис. 3. Участки нуклеотидных последовательностей 5.8, 18, 28S рДНК межгенной области штаммов *M. canis*, содержащие нуклеотидные замены

Fig. 3. *M. canis* strain intergenic region 5.8, 18, 28S rDNA nucleotide sequence sites containing nucleotide substitutions

DQ786689.1	CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAG-GGGGTGTCAG-ATGTGCCCGGGC
NR182327.1	CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAG-GGGGTGTCAG-ATGTGCCCGGGC
M2960421.1	CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAG-GGGGTGTCAG-ATGTGCCCGGGC
OW986609.1	CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAG-GGGGTGTCAG-ATGTGCCCGGGC
OP614985.1	-CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAG-GGGGTGTCAG-ATGTGCCCGGGC
MK922519.1	-CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAG-GGGGTGTCAG-ATGTGCCCGGGC
MK625725.1	-CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAG-GGGGTGTCAG-ATGTGCCCGGGC
MF152781.1	CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAG-GGGGTGTCAG-ATGTGCCCGGGC
LR794134.1	CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAG-GGGGTGTCAG-ATGTGCCCGGGC
KT155967.1	CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAG-GGGGTGTCAG-ATGTGCCCGGGC
OQ600605.1*	-CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAG-GGGGTGTCAG-ATGTGCCCGGGC
OQ592797.1*	-CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAG-GGGGTGTCAG-ATGTGCCCGGGC
OK376997.1	CCCCCAGCATAGG-AACTCAACGTTCCATCA-GGGGTGTCAG-ATGTGCCCGGGC
LN609556.1	CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAG-GGGGTGTCAG-ATGTGCCCGGGC
AB458165.1	CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAG-GGGGTGTCAG-ATGTGCCCGGGC
AB458188.1	CCCCCAGCATAGG-GACCAACGTTCCGTCAG-GGGGTGTCAG-ATGTGCCCGGGC

Рис. 4. Участки нуклеотидных последовательностей 5.8, 18, 28S рДНК межгенной области штаммов *T. benhamiae*, содержащие нуклеотидные замены

Fig. 4. *T. benhamiae* strain intergenic region 5.8, 18, 28S rDNA nucleotide sequence sites containing nucleotide substitutions

OW988573.1	GTCTCCCCCGGGCTCCCGGGGAGG-TGCGGGGGGGAGGGGTGCTCCGGCCGC
OW987261.1	GTCT-CCCCCGGGCTCCCGGGGAGG-TGCGGGGGGGAGGGGTGCTCCGGCCGC
OW985344.1	GTCT-CCCCCGGGCTCCCGGGGAGG-TGCGGGGGGGAGGGGTGCTCCGGCCGC
OW984872.1	GTCT-CCCCCGGGCTCCCGGGGAGG-TGCGGGGGGGAGGGGTGCTCCGGCCGC
OP802482.1	GTCT-CCCCCGGGCTCCCGGGGAGG-TGCGGGGGGGAGGGGTGCTCCGGCCGC
OP802480.1	GTCT-CCCCCGGGCTCCCGGGGAGG-TGCGGGGGGGAGGGGTGCTCCGGCCGC
OP227145.1	GTCT-CCCCCGGGCTCCCGGGGAGG-TGCGGGGGGGAGGGGTGCTCCGGCCGC
OL798928.1	GTCT-CCCCCGGGCTCCCGGGGAGG-TGCGGGGGGGAGGGGTGCTCCGGCCGC
MW767025.1	GTCT-CCCCCGGGCTCCCGGGGAGG-TGCGGGGGGGAGGGGTGCTCCGGCCGC
ONS2776.1*	-TCTCCCCCGGGCTCCCGGGGAGG-TGCGGGGGGGAGGGGTGCTCCGGCCGC
LC623726.1	GTCT-CCCCCGGGCTCCCGGGGAGG-TGCGGGGGGGAGGGGTGCTCCGGCCGC

Рис. 5. Участки нуклеотидных последовательностей 5.8, 18, 28S рДНК межгенной области штаммов *M. canis*, содержащие нуклеотидные замены

Fig. 5. *M. canis* strain intergenic region 5.8, 18, 28S rDNA nucleotide sequence sites containing nucleotide substitutions

ON479484.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGT
ON479483.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGT
OK376997.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGT
MT261760.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGT
MF152781.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGT
LS444190.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGT
LN874020.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGT
LC388864.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGT
KU496914.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGT
KU257463.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGT
JN134088.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGT
AB458165.1	TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGT

Рис. 6. Участки нуклеотидных последовательностей 5.8, 18, 28S рДНК межгенной области штаммов *Trichophyton spp.*, содержащие нуклеотидные замены

Fig. 6. *Trichophyton spp.* strain intergenic region 5.8, 18, 28S rDNA nucleotide sequence sites containing nucleotide substitutions

Исходя из полученных данных, следует отметить важность видовой идентификации возбудителей дерматофитозов. Особенно актуальным это является для вида *T. benhamiae* – нового возбудителя дерматофитоза кошек, впервые выделенного нами на территории России [18].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате филогенетического анализа 12 штаммов рода *Microsporium* и 2 штаммов рода *Trichophyton* определен высокий процент гомологии их нуклеотидных последовательностей. Сравнительный анализ фрагментов генов рибосомальной РНК грибов рода *Microsporium* и *Trichophyton* с референтными штаммами в каждом случае показал относительно невысокий уровень внутривидового полиморфизма и точечных мутаций последовательностей. Это указывает на то, что определение нуклеотидных последовательностей генов 5.8, 18, 28S рДНК ITS-области может рассматриваться в качестве быстрого и достоверного метода идентификации близкородственных видов дерматофитов родов *Trichophyton* и *Microsporium*. Выявленное сходство нуклеотидных последовательностей у анализируемых и референтных штаммов дерматофитов указывает на достоверность полученных результатов и возможность применения методов молекулярной диагностики для их видовой идентификации.

Таким образом, метод ITS-ПЦР является достоверным и надежным для идентификации близкородственных видов дерматофитов, что позволяет его использовать для диагностики дерматофитозов кошек и собак.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Gräser Y., Scott J., Summerbell R. The new species concept in dermatophytes – a polyphasic approach. *Mycopathologia*. 2008; 166 (5–6): 239–256. DOI: 10.1007/s11046-008-9099-9.
- Ivaskiene M., Matusevicius A. P., Grigonis A., Zamokas G., Babickaite L. Efficacy of topical therapy with newly developed terbinafine and econazole formulations in the treatment of dermatophytosis in cats. *Pol. J. Vet. Sci.* 2016; 19 (3): 535–543. DOI: 10.1515/pjvs-2016-0067.
- Gordon E., Idle A., DeTar L. Descriptive epidemiology of companion animal dermatophytosis in a Canadian Pacific Northwest animal shelter system. *Can. Vet. J.* 2020; 61 (7): 763–770. PMID: 32655161.
- Paryuni A. D., Indarjulianto S., Widyarani S. Dermatophytosis in companion animals: A review. *Vet. World*. 2020; 13 (6): 1174–1181. DOI: 10.14202/vetworld.2020.1174-1181.
- Chupia V., Ninsuwon J., Piyarungsri K., Sodarar C., Prachasilchai W., Suriyasathaporn W., Pikulkaew S. Prevalence of *Microsporium canis* from pet cats in small animal hospitals, Chiang Mai, Thailand. *Vet. Sci.* 2022; 9 (1):21. DOI: 10.3390/vetsci9010021.
- Ibrahim M. A., Abdel-Latef G. K., Abdel-Rahim M. M., Aziz S. A. A. Epidemiologic and molecular characterization of zoonotic dermatophytes

from pet dogs and cats in Egypt. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 2021; 9 (12): 2225–2233. DOI: 10.17582/journal.aavs/2021/9.12.2225.2233.

7. Kidd S. E., Weldhagen G. F. Diagnosis of dermatophytes: from microscopy to direct PCR. *Microbiology Australia*. 2022; 43 (1): 9–13. DOI: 10.1071/MA22005.

8. Kondori N., Tehrani P. A., Strömbeck L., Faergemann J. Comparison of dermatophyte PCR kit with conventional methods for detection of dermatophytes in skin specimens. *Mycopathologia*. 2013; 176 (3–4): 237–241. DOI: 10.1007/s11046-013-9691-7.

9. Choi J., Kim S. H. A genome tree of life for the Fungi kingdom. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017; 114 (35): 9391–9396. DOI: 10.1073/pnas.1711939114.

10. Остроумов Л. А., Садовая Т. Н., Беспоместных К. В. Филогенетический анализ типовых штаммов плесеней *Roqueforti*, *Camemberti* рода *Penicillium*. *Техника и технология пищевых производств*. 2010; 3 (18): 107–111. EDN: MVQESD.

Ostroumov L. A., Sadovaya T. N., Bepomestnykh K. V. Phylogenetic analysis of type strains of fungi *Roqueforti*, *Camemberti* genus *Penicillium*. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2010; 3 (18): 107–111. EDN: MVQESD. (in Russ.)

11. Yamada S., Anzawa K., Mochizuki T. Molecular epidemiology of *Microsporium canis* isolated from Japanese cats and dogs, and from pet owners by multilocus microsatellite typing fragment analysis. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2022; 75 (2): 105–113. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2020.809.

12. Jarjees K. I., Issa N. A. First study on molecular epidemiology of dermatophytosis in cats, dogs, and their companions in the Kurdistan region of Iraq. *Vet. World*. 2022; 15 (12): 2971–2978. DOI: 10.14202/vetworld.2022.2971-2978.

13. Katirae F., Kouchak Kosari Y., Soltani M., Shokri H., Hassan Minooieanhighi M. Molecular identification and antifungal susceptibility patterns of dermatophytes isolated from companion animals with clinical symptoms of dermatophytosis. *J. Vet. Res.* 2021; 65 (2): 175–182. DOI: 10.2478/jvetres-2021-0020.

14. White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Ed. by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White. New York: Academic Press; 1990; 315–322. DOI: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.

15. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987; 4 (4): 406–425. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.

16. Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101 (30): 11030–11035. DOI: 10.1073/pnas.0404206101.

17. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 2021; 38 (7): 3022–3027. DOI: 10.1093/molbev/msab120.

18. Smagulova A. M., Kukhar Ye. V., Glotova T. I., Glotov A. G., Kim A. S. First record of *Trichophyton benhamiae* isolated from domestic cats in Russia. *Med. Mycol. Case Rep.* 2023; 40: 16–21. DOI: 10.1016/j.mmcr.2023.01.001.

Поступила в редакцию / Received 15.05.2023

Поступила после рецензирования / Revised 07.06.2023

Принята к публикации / Accepted 14.08.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Смагулова Айнура Муратовна, магистр, старший научный сотрудник, соискатель, НАО «КАТУ им. С. Сейфуллина», г. Астана, Республика Казахстан; ИЭВСиДВ СФНЦА РАН, р. п. Краснообск, Новосибирская обл., Россия; <https://orcid.org/0000-0002-3067-3666>, e-mail: smagulova-ainura@inbox.ru.

Кухар Елена Владимировна, доктор биологических наук, доцент, НАО «КАТУ им. С. Сейфуллина», г. Астана, Республика Казахстан; <https://orcid.org/0000-0003-3794-434X>, e-mail: kucharev@mail.ru.

Глотова Татьяна Ивановна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, ИЭВСиДВ СФНЦА РАН, р. п. Краснообск, Новосибирская обл., Россия; <https://orcid.org/0000-0003-3538-8749>, e-mail: t-glotova@mail.ru.

Глотов Александр Гаврилович, доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник, ИЭВСиДВ СФНЦА РАН, р. п. Краснообск, Новосибирская обл., Россия; <https://orcid.org/0000-0002-2006-0196>, e-mail: glotov_vet@mail.ru.

Ainura M. Smagulova, Master, Senior Researcher, External PhD Student, “S. Seifullin KATU” NCJSC, Astana, Republic of Kazakhstan; Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East SFSCA RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk Oblast, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-3067-3666>, e-mail: smagulova-ainura@inbox.ru.

Elena V. Kukhar, Doctor of Science (Biology), Associate Professor, “S. Seifullin KATU” NCJSC, Astana, Republic of Kazakhstan; <https://orcid.org/0000-0003-3794-434X>, e-mail: kucharev@mail.ru.

Tatyana I. Glotova, Doctor of Science (Biology), Professor, Chief Researcher, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East SFSCA RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk Oblast, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-3538-8749>, e-mail: t-glotova@mail.ru.

Alexander G. Glotov, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Chief Researcher, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East SFSCA RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk Oblast, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-2006-0196>, e-mail: glotov_vet@mail.ru.



Оплата труда ветеринарных специалистов государственной ветеринарной службы в субъектах Российской Федерации

И. М. Клиновицкая¹, М. А. Шибаяев¹, А. К. Караулов¹, А. М. Селянин²

¹ ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

² ГБУ «Владимирская областная станция по борьбе с болезнями животных» (ГБУ «Владимирская областная СББЖ»), г. Владимир, Россия

РЕЗЮМЕ

Одним из главных факторов, способных мотивировать работника к продуктивному труду, а также влиять на престиж профессии, является уровень заработной платы. В статье представлены результаты анализа заработной платы ветеринарных специалистов государственной ветеринарной службы в целом по стране, по федеральным округам, по 85 регионам страны, а также на различных уровнях организации ветеринарной службы в 2021 г. Приведена оценка заработной платы ветспециалистов в сравнении с зарплатой, сложившейся в целом по экономике субъектов Российской Федерации. Размер среднемесячной заработной платы ветеринарных специалистов в целом по госветслужбе варьируется в широком диапазоне: от 16,3 до 114,9 тыс. руб. На разных уровнях организации госветслужбы отличия между минимальной и максимальной заработной платой составляют 5–8 раз. Размер оплаты труда ветспециалистов не достигает размера оплаты труда, сложившегося по экономике своих субъектов, в целом по госветслужбе – в 69 регионах страны, в учреждениях лечебно-профилактического звена – в 71 субъекте, в организациях лабораторно-диагностического профиля – в 72 субъектах. Из всех федеральных округов наибольшее отставание в заработной плате отмечается в Северо-Кавказском федеральном округе как в абсолютном значении (около 21 тыс. руб.), так и по отношению к средней по экономике субъектов данного федерального округа (64%). В работе рассмотрены также значения модальной и медианной заработной плат ветеринарных специалистов, позволяющие с разных сторон оценить размер оплаты труда данной категории сотрудников госветслужбы.

Ключевые слова: оплата труда, финансирование ветеринарной службы, ветеринарный специалист, ветеринарная служба, уровни организации ветеринарной службы, медианная зарплата, модальная зарплата

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

Для цитирования: Клиновицкая И. М., Шибаяев М. А., Караулов А. К., Селянин А. М. Оплата труда ветеринарных специалистов государственной ветеринарной службы в субъектах Российской Федерации. *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (3): 265–272. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-265-272.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Клиновицкая Ирина Михайловна, кандидат экономических наук, старший научный сотрудник информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрвец, e-mail: klinovitskaya@arriah.ru.

Remuneration of veterinary specialists of the State Veterinary Service in the Russian Federation Subjects

I. M. Klinovitskaya¹, M. A. Shibayev¹, A. K. Karaulov¹, A. M. Selyanin²

¹ FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

² GBI "Vladimir Oblast Animal Disease Control Station", Vladimir, Russia

SUMMARY

Remuneration is one of the main factors that can motivate an employee to work productively, as well as influence the prestige of a profession. The paper presents the results of analysis of remuneration of the veterinary specialists of the State Veterinary Service for the country as a whole, for the federal districts and 85 regions of the country, as well as at various organizational levels within the Veterinary Service for 2021. The assessment of the veterinary specialist salary level as compared with that throughout the economy of the Russian Federation Subjects is presented. The veterinary specialist average monthly salary for the State Veterinary Service as a whole varies within a wide range: from 16.3 to 114.9 thousand rubles. The minimum and maximum salaries at different organizational levels within the State Veterinary Service differ 5–8-fold. The veterinary specialist salary level is lower than that for the economy of the relevant Russian Federation Subject: for the State Veterinary Service as a whole – in 69 regions of the country, for treatment and preventive care institutions – in 71 Subjects, in laboratory diagnosis institutions – in 72 Subjects. Of all the federal districts, the North Caucasian Federal District has the lowest veterinary specialist salary level both in absolute terms (about 21 thousand rubles) and as compared with the average for the economy of the Subjects of this federal district (64%). The paper also examines veterinary specialist modal and median salary values, which allow for the assessment of remuneration of this category of the State Veterinary Service staff from different viewpoints.

Keywords: remuneration, funding of the Veterinary Service, veterinary specialist, Veterinary Service, organizational levels within the Veterinary Service, median salary, modal salary

Acknowledgements: This work was funded by the FGBI "ARRIAH" within the scope of research activities "Veterinary Welfare".

For citation: Klinovitskaya I. M., Shibayev M. A., Karaulov A. K., Selyanin A. M. Remuneration of veterinary specialists of the State Veterinary Service in the Russian Federation Subjects. *Veterinary Science Today*. 2023; 12 (3): 265–272. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-265-272.

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

For correspondence: Irina M. Klinovitskaya, Candidate of Science (Economics), Senior Researcher, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: klinovitskaya@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из чрезвычайно востребованных субъектов профессиональной деятельности является ветеринарный специалист. От эффективной организации ветеринарной службы в стране зависит не только здоровье животных, но и людей, так как некоторые болезни животных представляют опасность и для человека. Кроме того, ветеринарии отводится важная роль в обеспечении продовольственной безопасности страны.

На качественную и эффективную работу государственной ветеринарной службы оказывают влияние многие факторы, среди которых важное место занимает размер заработной платы, зависящий от территориального местонахождения, возможности бюджета региона, масштаба ветучреждения, квалификации ветспециалиста и многого другого. Уровень заработной платы чаще всего является основным мотивирующим фактором для качественного выполнения возложенных на работника обязанностей, поэтому данный показатель влияет и на обеспеченность отрасли квалифицированными кадрами [1]. При этом не всегда компенсация труда ветспециалиста соответствует сложности его работы, ее ответственности и значимости. Поэтому необходимо предпринимать активные меры для совершенствования системы оплаты труда ветеринарных специалистов для сохранения и развития кадрового потенциала. Обеспечение данной категории работников заработной платой достойного уровня является основой для качественного выполнения поставленных задач и повышения престижа профессии [2]. Тем более что повышение уровня жизни населения, сглаживание диспропорций между регионами страны является одним из главных направлений социальной политики государства [3, 4].

Целью данного исследования явилась оценка уровня заработной платы ветеринарных специалистов в целом по госветслужбе, в субъектах страны, на разных уровнях организации ветеринарной службы Российской Федерации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Практической основой для анализа уровня заработной платы ветеринарных специалистов государственной ветеринарной службы субъектов РФ послужили сведения, предоставленные органами исполнительной власти субъектов РФ в области ветеринарии за 2021 г. по разработанной в ФГБУ «ВНИИЗЖ» форме для сбора первичных данных по следующим уровням организации ветеринарной службы:

– органы исполнительной власти субъекта РФ в области ветеринарии без подведомственных учреждений (департаменты, комитеты, управления и т. д.);

– учреждения лечебно-профилактического звена (станции по борьбе с болезнями животных, ветцентры, ветлечебницы, ветучастки, ветпункты и т. д.);

– учреждения лабораторно-диагностического профиля (ветеринарно-диагностические лаборатории различного уровня: областные, районные, межрайонные и т. д.).

Информация поступила из 85 субъектов РФ. Сбор данных был обеспечен посредством компонента ФГИС «ВетИС» «Ассоль.Экспресс».

Теоретической и методологической основой для исследования явились нормативно-правовые акты Российской Федерации, материалы Росстата и методы анализа, реализованные в современных научных работах по данной тематике.

В данном исследовании использовали аналитический метод, а также методы сравнительного анализа, описательной статистики, сводки, группировки, графики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Финансирование деятельности государственной ветеринарной службы субъектов Российской Федерации осуществлялось из трех источников: федерального бюджета, бюджетов самих субъектов и внебюджетных источников [5, 6]. Доля средств, направленных на выплату заработной платы, составила в среднем 65% от общего объема финансирования данной отрасли. На заработную плату сотрудников средства поступали в следующей пропорции: 2% – из федерального бюджета (поступления были только в 12 субъектов), 61% – из бюджетов субъектов РФ и 37% – из внебюджетных источников учреждений ветеринарии госветслужбы регионов.

В разных субъектах страны доля средств, направленных на выплату заработной платы, варьировала от 26 до 86% от общего объема финансирования ветеринарной службы региона. Но, как показали результаты анализа, нет прямой зависимости между этим показателем и уровнем заработной платы ветспециалистов (зарплаты как в абсолютном выражении, так и относительно средней зарплаты, сложившейся по экономике конкретного субъекта). Все зависит от реальных объемов финансирования конкретной ветеринарной службы страны.

На рисунке 1 отражен размер среднемесячной заработной платы ветспециалистов госветслужбы в целом и на разных уровнях организации ветеринарной службы.

Как показывают данные, величина среднемесячной заработной платы ветспециалистов в целом по госветслужбе между субъектами РФ варьирует в широком диапазоне: от 16,3 до 114,9 тыс. руб. при среднем уровне 42 тыс. руб. В лечебно-профилактическом звене значе-

ния заработных плат различаются в 7 раз, в лабораторно-диагностическом секторе – в 5 раз, в органах исполнительной власти в области ветеринарии – в 8 раз.

Большой разброс в оплате труда наблюдается и по федеральным округам. Так, в целом по ветслужбе он составил от 21 тыс. руб. в Северо-Кавказском федеральном округе до 64 тыс. руб. в Дальневосточном федеральном округе (рис. 2). Высокие доходы чаще всего регистрируются в субъектах, где существуют северные надбавки и другие компенсации, а также в г. Москве. Сравнивать данные регионы со многими другими не совсем корректно, поэтому более значимым будет относительный показатель, представляющий собой отношение зарплат ветспециалистов в субъекте к заработной плате, сложившейся в целом по экономике данного субъекта (рис. 3).

Так, на диаграмме видно, что показатель средней заработной платы ветспециалистов в целом по ветслужбе в 69 из 85 регионов страны не достигает уровня среднемесячной номинальной заработной платы по экономике конкретного субъекта, из них в 24 субъектах средняя заработная плата составила от 81 до 90% от размера оплаты труда в регионе. Выше средней по субъекту оплачивалась профессия специалиста в области ветеринарии только в 16 регионах страны. К сожалению, в двух субъектах средняя величина зарплат ветспециалистов относительно сложившегося уровня по экономике данных субъектов составила всего 41 и 44%.

В организациях, занятых лечебно-профилактической деятельностью в области ветеринарии, более чем в половине регионов страны (в 46) заработная плата ветеринарных специалистов составляла от 71 до 90% от среднемесячной заработной платы, сложившейся в экономике соответствующих субъектов (рис. 4). Ближе к региональному уровню были зарплаты всего в 9 субъектах, выше региональных – в 14. Наибольшие отставания в заработной плате отмечены в 16 субъектах страны, которые уступали среднему размеру оплаты труда в соответствующих регионах на 30–50%.

В ветеринарно-диагностических лабораториях в 19 регионах оплата труда ветспециалистов составляла от 71 до 80% от среднемесячной заработной платы, сложившейся по экономике данных субъектов (рис. 5). Ниже этого предела начислялись выплаты в 28 субъектах страны, причем в 5 из них они составляли всего 34–44% от средней зарплаты конкретного региона. Наиболее оптимистично выглядит ситуация с заработной платой только в 10 субъектах страны.

Компенсация труда сотрудников органов исполнительной власти в области ветеринарии только в 5 субъектах находилась ниже средней номинальной начисленной заработной платы в соответствующем субъекте, в остальных регионах она превышала данный уровень.

Отечественная статистика в основном использует показатель средней заработной платы. Но из-за большого расслоения в доходах работников она не совсем точно отражает реальный уровень оплаты труда, поэтому интересным является соотношение средней заработной платы с самой распространенной (модальной) и срединной (медианной) [7, 8]. Рассмотрим значения данных видов заработных плат ветеринарных специалистов госветслужбы и сравним их со средними значениями, приведенными выше.

Модальная заработная плата – это наиболее часто встречающееся значение оплаты труда среди конкретных категорий работников, в нашем случае – среди ве-



Рис. 1. Оплата труда ветспециалистов в РФ по уровням организации ветслужбы, тыс. руб.

Fig. 1. Veterinary specialist remuneration in the Russian Federation by organizational level within the Veterinary Service, thousand rubles

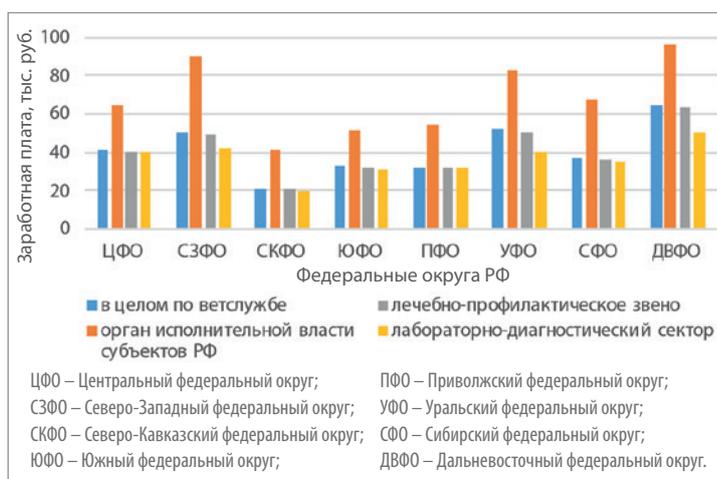


Рис. 2. Оплата труда ветспециалистов в федеральных округах РФ, тыс. руб.

Fig. 2. Veterinary specialist remuneration in the federal districts of the Russian Federation, thousand rubles



Рис. 3. Уровень оплаты труда ветспециалистов в целом по госветслужбе по отношению к средней по экономике субъекта РФ

Fig. 3. Veterinary specialist salary level for the State Veterinary Service as a whole as compared with the average for the Russian Federation Subject economy

теринарных специалистов [9]. Распределение значений зарплат ветспециалистов на основании фактических данных по 85 субъектам страны отражено на рисунке 6.

Исходя из представленных данных, модальная зарплата ветспециалистов в России в целом по ветслужбе



Рис. 4. Уровень оплаты труда ветспециалистов лечебно-профилактического звена по отношению к средней по экономике субъекта РФ

Fig. 4. Veterinary specialist salary level for treatment and preventive care institutions as compared with the average for the Russian Federation Subject economy



Рис. 5. Уровень оплаты труда ветспециалистов лабораторно-диагностического звена по отношению к средней по экономике субъекта РФ

Fig. 5. Veterinary specialist salary level for laboratory diagnosis institutions as compared with the average for the Russian Federation Subject economy

колебалась в пределах 35–40 тыс. руб.; в органах исполнительной власти в области ветеринарии – 50–55 тыс. руб.; в учреждениях лечебно-профилактического звена – 35–40 тыс. руб.; в учреждениях лабораторно-диагностического профиля – 25–30 тыс. руб.

Внутри интервалов, где частота значений максимальная (соответственно 18, 13, 20 и 19), было определено условное значение моды по формуле:

$$Mo = X_{Mo} + i_{Mo} \frac{f_{Mo} - f_{Mo-1}}{2f_{Mo} - f_{Mo-1} - f_{Mo+1}},$$

где Mo – мода;

X_{Mo} – нижняя (начальная) граница модального интервала;

i_{Mo} – размах модального интервала (разность между его верхней и нижней границей);

f_{Mo} – частота модального интервала;

f_{Mo-1} – частота интервала, предшествующего модальному;

f_{Mo+1} – частота интервала, следующего за модальным.

В результате расчетов по каждому уровню организации ветеринарной службы получилось, что модальная зарплата ветспециалистов госветслужбы в целом по РФ составила порядка 36 тыс. руб.; в органах исполнительной власти – 54 тыс. руб.; в лечебно-профилактическом звене – 35 тыс. руб.; в лабораторно-диагностическом секторе – 28 тыс. руб., что несколько меньше, чем их среднеарифметические значения, описываемые выше.

Если модальная зарплата отражает наиболее распространенное значение зарплаты данной категории специалистов в отрасли, то медианная является серединой динамического ряда всех рассматриваемых зарплат в 85 субъектах РФ. То есть медианная зарплата говорит о том, что в 50% субъектов ветспециалисты госветслужбы России получают больше данной суммы, а другая половина – меньше [10, 11].

При разбросе уровня зарплат ветспециалистов в целом по ветслужбе в субъектах РФ от 16,3 ($n = 1$) до 114,9 ($n = 85$) тыс. руб. медианное значение составило 37,0 тыс. руб. ($n = 43$), где n – порядковый номер субъекта в ранжированном ряду зарплат. То есть в 42 субъектах страны уровень заработной платы ветспециалистов в целом по госветслужбе ниже 37,0 тыс. руб. В органах исполнительной власти данное значение соответствует порядку 58 тыс. руб.; в лечебно-профилактическом звене – 36 тыс. руб.; в лабораторно-диагностическом секторе – 35 тыс. руб.

Следует отметить, что медианная заработная плата в настоящее время является важным показателем при определении минимального размера оплаты труда в стране (МРОТ), который зависит не от прожиточного минимума трудоспособного населения, как было ранее, а с 2021 г. устанавливается с учетом медианной зарплаты [12, 13]. Более наглядно рассмотренные виды заработных плат представлены на рисунке 7.

Так, рассматривая значения в целом по ветслужбе, средняя арифметическая зарплата составила 42 тыс. руб., но в таком размере и больше получали ветспециалисты только в 25 субъектах страны. В половине регионов РФ ветеринарным специалистам выплачивали зарплату больше 37 тыс. руб., в половине – меньше этой суммы. В интервале заработных плат 35–40 тыс. руб. с оплатой труда, близкой к 36 тыс. руб., находится наиболее часто выплачиваемая величина заработной платы данной категории сотрудников госветслужбы. Таким образом, произведенные расчеты позволили с разных сторон оценить уровень оплаты труда работников государственных учреждений ветеринарии.

Представленная в работе информация свидетельствует о том, что заработная плата основной массы ветеринарных специалистов государственной ветеринарной службы РФ находится на невысоком уровне, при этом наблюдаются большие расхождения в доходах специалистов, работающих в разных регионах страны. Такая ситуация, на наш взгляд, не совсем справедлива. Возможно, будет целесообразным при определении заработной платы ветспециалистов последовать принципу установления зарплаты медицинских работников, ведь данные профессии во многом имеют сходство, поэтому такая аналогия будет, по нашему мнению, вполне уместна. Так, согласно майским указам, средняя заработная плата врачей должна составлять 200% от средней заработной платы в соответствующем регионе [14]. Кроме того, существует программа «Земский доктор»,

предусматривающая выплату медицинским работникам, которые на определенных условиях трудоустроились в сельской местности, до 2 млн руб. [15]. Также, согласно постановлению Правительства РФ от 1 июня 2021 г. № 847, в 2022 г. в 7 регионах страны запущен пилотный проект, направленный на дальнейшее совершенствование системы оплаты труда медицинских работников [16].

Таким образом, в области здравоохранения постоянно разрабатываются подходы для регулирования заработной платы, что хотелось бы видеть и в ветеринарной отрасли. Справедливости ради следует отметить, что в «Единые рекомендации по установлению на федеральном, региональном и местном уровнях систем оплаты труда работников государственных и муниципальных учреждений на 2020 год» (далее – Единые рекомендации) впервые был внесен новый раздел, касающийся особенностей формирования систем оплаты труда работников государственных учреждений ветеринарии [17]. Однако в данном документе и Единых рекомендациях на 2021 г. не был определен ориентир нижней границы заработной платы ветеринарных работников, а только указано, что оплата труда в каждом из этих периодов не должна быть ниже заработной платы, достигнутой в предыдущем году [18]. И только в Единых рекомендациях на 2022 г. появилось новое дополнение, предусматривающее поэтапное достижение уровня оплаты труда не ниже размера среднемесячной заработной платы работников по субъекту Российской Федерации [19]. Аналогичные рекомендации закреплены также в распоряжении Правительства РФ от 7 декабря 2022 г. № 3789-р [20]. Поэтому есть надежда, что начиная с 2023 г. можно будет увидеть другую, более оптимистичную картину по уровню заработных плат ветеринарных специалистов в субъектах страны.

Во многих регионах РФ относительно невысокие оплаты труда работников государственных учреждений ветеринарии в анализируемом 2021 г. частично компенсировались различными мерами социальной поддержки ветеринарных специалистов. Так, по данным органов исполнительной власти субъектов РФ в области ветеринарии за 2021 г., в 24 регионах разработана программа по совершенствованию кадрового обеспечения ветслужбы субъекта (в том числе и по привлечению молодых специалистов); в 38 субъектах существует процедура предоставления жилья либо денежных выплат на приобретение или найм жилья; в 57 регионах реализуется механизм целевого приема абитуриентов в вузы по специальности «ветеринария», но, к сожалению, после данного обучения за последние 10 лет трудоустроились в учреждения госветслужбы только 40% молодых специалистов.

Сравнивая в процессе анализа заработные платы медицинских работников и ветеринарных специалистов по федеральным округам, выявилась следующая закономерность: в тех округах, где выше уровень заработной платы медиков, в этих же округах, как правило, выше уровень заработной платы и ветспециалистов [21].

Проблема заработной платы ветеринарных специалистов решается в каждом регионе самостоятельно в зависимости от местного бюджета, поэтому необходима федеральная программа материальной поддержки ветспециалистов (особенно молодых специалистов). Ведь низкая заработная плата делает профессию ветеринарного врача менее привлекательной,



Рис. 6. Распределение субъектов РФ по размеру зарплат ветспециалистов на разных уровнях организации ветслужбы

Fig. 6. Distribution of the Russian Federation Subjects by veterinary specialist salary at different organizational levels within the Veterinary Service

что отражается на неполной укомплектованности регионов ветеринарными кадрами: только в 7 субъектах из 85 данные вакансии полностью закрыты. При этом от работы ветеринарных специалистов напрямую зависит эпизоотическое и эпидемическое благополучие нашей страны.

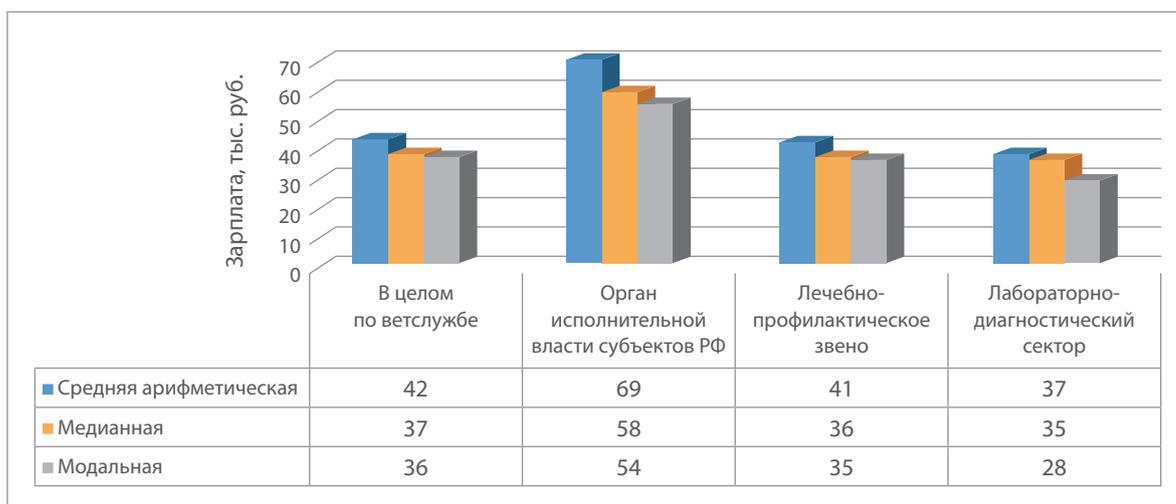


Рис. 7. Сравнительные данные средней арифметической, модальной и медианной зарплат ветспециалистов госветслужбы РФ

Fig. 7. Comparative data on arithmetic mean, modal and median salaries for veterinary specialists of the State Veterinary Service of the Russian Federation

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ информации о заработной плате ветеринарных специалистов, предоставленной органами исполнительной власти субъектов РФ в области ветеринарии, позволил оценить размер оплаты труда работников государственных учреждений ветеринарии как в целом по стране, так и по федеральным округам и отдельным субъектам.

Главным источником финансирования заработной платы служили бюджеты субъектов РФ, составившие 61% от общего объема финансирования, предназначенного для выплаты зарплаты сотрудникам.

Размер среднемесячной заработной платы ветспециалистов имеет существенные различия между субъектами страны (в 7 раз). В 69 из 85 регионов РФ зарплата ветеринаров в целом по ветслужбе ниже среднемесячного уровня заработной платы, сложившегося по экономике данных субъектов.

Установлено, что наиболее часто выплачиваемая величина заработной платы данной категории сотрудников находится в интервале 35–40 тыс. руб. и составляет около 36 тыс. руб. При этом в половине субъектов страны ветспециалисты в целом по госветслужбе получают больше 37 тыс. руб. в месяц, в другой половине – меньше этой суммы.

Невысокие уровни заработных плат ветеринарных специалистов государственной ветеринарной службы свидетельствуют о недостаточном финансировании данной отрасли. На наш взгляд, необходимо принять дополнительные меры для справедливого регулирования заработной платы, закрепленные в федеральных программах. В данных программах, например, можно предусмотреть стимулирующие выплаты ветеринарным службам субъектов за сохранение на их территории эпизоотического благополучия по особо опасным болезням животных. Однако данное предложение требует детальной проработки вследствие наличия вероятности получения эффекта мнимого эпизоотического благополучия на подконтрольных территориях. Поводом для материального стимулирования ветспециалистов региональных ветеринарных служб может служить также получение статуса региона, свободного

от какой-либо инфекционной болезни животных, в рамках регионализации РФ [22, 23]. Признание данного статуса повышает значимость региона для привлечения инвестиций в экономику субъекта, в том числе в животноводство и сельское хозяйство в целом.

Подобные ежегодные стимулирующие выплаты можно законодательно оформить и на региональном уровне, то есть из бюджета субъекта осуществлять доплаты ветспециалистам тех муниципальных районов, где в течение года существовало эпизоотическое благополучие по особо опасным болезням животных. Такой подход, на наш взгляд, ведет к коллективной заинтересованности ветеринаров каждого субъекта / муниципального района прилагать максимум усилий для поддержания эпизоотического благополучия в своем регионе. Работа в сфере ветеринарии требует от специалистов глубоких знаний, отработанных навыков и непрерывного совершенствования профессионального мастерства. Поэтому ветеринарная деятельность в нашей стране должна быть достойно оплачиваема.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Декина М. П. Статистический анализ факторов дифференциации оплаты труда в Российской Федерации. *Известия Санкт-Петербургского государственного экономического университета*. 2016; 1 (97): 98–102. EDN: VLNNKL.
2. Балабанова Л. Н., Шилова А. А. Достойная оплата труда как фактор экономического развития населения страны. *Статистический анализ социально-экономического развития субъектов Российской Федерации: материалы IX Международной научно-практической конференции (7–8 апреля 2022 г.)*. Брянск: БГИТУ; 2022; 34–37. EDN: BPGMAV.
3. Репринцева Е. В. Анализ дифференциации оплаты труда в различных сферах экономической деятельности в РФ. *Славянский форум*. 2019; 4 (26): 254–260. EDN: HOVRMJ.
4. Пархомчук М. А., Грязнова О. А., Гребнева М. Е., Виноградова Н. И. О проблеме дифференциации уровня оплаты труда в регионах ЦФО. *Азимут научных исследований: экономика и управление*. 2021; 10 (1): 247–250. DOI: 10.26140/anie-2021-1001-0060.
5. Никитин И. Н. Организация и экономика ветеринарного дела. 6-е изд., перераб. и доп. СПб.: Лань; 2014. 368 с.
6. Клиновицкая И. М., Шибяев М. А., Караулов А. К. Финансовое обеспечение деятельности государственной ветеринарной службы субъектов Российской Федерации. *Ветеринария сегодня*. 2021; (2): 159–165. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-2-37-159-165.
7. Комар О. Н. Статистический анализ заработной платы в виде экономической деятельности «Образование». *Балтийский экономический журнал*. 2022; 2 (38): 11–21. DOI: 10.46845/2073-3364-2022-0-2-11-21.

8. Самая распространенная зарплата в России и насколько она ниже средней? Почему у 70% людей зарплата ниже среднего уровня? Режим доступа: <https://vc.ru/finance/128505-samaya-rasprostrannaya-zarplata-v-rossii-i-naskolko-ona-nizhe-sredney-pochemu-u-70-lyudey-zarplata-nizhe-srednego-urovnya> (дата обращения: 10.11.2022).

9. Статистика: учебник. Под ред. И. И. Елисейевой. М.: ВИТРЭМ; 2010. 443 с.

10. Данилов Д. Медианная зарплата в России 2021: размеры по региону, отраслям и годам. Режим доступа: <https://top-rf.ru/investitsii/513-zarplata.html> (дата обращения 11.11.2022).

11. О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации: федеральный закон от 29.12.2020 № 473-ФЗ. Режим доступа: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_372636.

12. Об утверждении методики расчета показателя «Медианная заработная плата»: приказ Росстата от 31.12.2020 № 870. Режим доступа: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_389382.

13. Колобова С. В. МРОТ и медианная заработная плата в механизме правового регулирования оплаты труда. *Современное право*. 2021; 2: 60–67. DOI: 10.25799/NL.2021.59.96.009.

14. О мероприятиях по реализации государственной социальной политики: указ Президента Российской Федерации от 07.05.2012 № 597. Режим доступа: <http://www.kremlin.ru/acts/bank/35261>.

15. Об утверждении государственной программы Российской Федерации «Развитие здравоохранения»: постановление Правительства РФ от 26.12.2017 № 1640 (с изменениями и дополнениями). Режим доступа: <https://base.garant.ru/71848440>.

16. О реализации пилотного проекта в целях утверждения требований к системам оплаты труда медицинских работников государственных и муниципальных учреждений здравоохранения: постановление Правительства РФ от 01.06.2021 № 847. Режим доступа: <http://government.ru/docs/all/134737>.

17. Единые рекомендации по установлению на федеральном, региональном и местном уровнях систем оплаты труда работников государственных и муниципальных учреждений на 2020 год: утв. решением Российской трехсторонней комиссии по регулированию социально-трудовых отношений от 24.12.2019, протокол № 11. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/564110931>.

18. Единые рекомендации по установлению на федеральном, региональном и местном уровнях систем оплаты труда работников государственных и муниципальных учреждений на 2021 год: утв. решением Российской трехсторонней комиссии по регулированию социально-трудовых отношений от 29.12.2020, протокол № 13. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/573218356>.

19. Единые рекомендации по установлению на федеральном, региональном и местном уровнях систем оплаты труда работников государственных и муниципальных учреждений на 2022 год: утв. решением Российской трехсторонней комиссии по регулированию социально-трудовых отношений от 23.12.2021, протокол № 11. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/727836846>.

20. Об утверждении плана мероприятий («дорожной карты») по совершенствованию системы ветеринарной безопасности Российской Федерации: распоряжение Правительства РФ от 07.12.2022 № 3789-р. Режим доступа: <https://www.zakonrf.info/rasporiazhenie-pravitelstvo-rf-3789-r-07122022>.

21. Итоги федерального статистического наблюдения в сфере оплаты труда отдельных категорий работников социальной сферы и науки за январь – декабрь 2021 года. Режим доступа: <https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/itog-monitor04-21.htm>.

22. Об утверждении Ветеринарных правил проведения регионализации территории Российской Федерации: приказ МСХ РФ от 14.12.2015 № 635. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/420325658>.

23. О внесении изменений в перечень заразных болезней животных, по которым проводится регионализация территории Российской Федерации, прилагаемый к Ветеринарным правилам проведения регионализации территории Российской Федерации, утвержденным приказом Минсельхоза России от 14 декабря 2015 г. № 635: приказ МСХ РФ от 08.12.2020 № 735. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/573339097>.

REFERENCES

1. Dekina M. P. Statistical analysis of factors of wage differentiation in Russian Federation. *Izvestia Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo ekonomicheskogo universiteta*. 2016; 1 (97): 98–102. EDN: VLNNKL. (in Russ.)

2. Balabanova L. N., Shilova A. A. Dostoinaya oplata truda kak faktor ekonomicheskogo razvitiya naseleniya strany = Decent remuneration as a factor of economic development of the population of the country. *Statisticheskii analiz sotsial'no-ekonomicheskogo razvitiya sub'ektov Rossiiskoi Federatsii: materialy IX Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (7–8 aprelya 2022 g.) = Statistical analysis of social and eco-*

nomic development of the Russian Federation Subjects: proceedings of the IX International Research-to-Practice Conference (7–8 April 2022). Bryansk: Bryansk State Technological University of Engineering; 2022; 34–37. EDN: BPGMAB. (in Russ.)

3. Repritsva E. V. Analysis of differentiation of payment of labor in the fields of economic activity in the Russian Federation. *Slavic forum*. 2019; 4 (26): 254–260. EDN: HOVRMJ. (in Russ.)

4. Parkhomchuk M. A., Gryaznova O. A., Grebneva M. E., Vinogradova N. I. The problem of differentiation in the regions of the CFD. *Azimuth of Scientific Research: Economics and Administration*. 2021; 10 (1): 247–250. DOI: 10.26140/anie-2021-1001-0060. (in Russ.)

5. Nikitin I. N. Organization and economics of veterinary practices. 6th ed., revised and supplemented. Saint Petersburg: Lan'; 2014. 368 p. (in Russ.)

6. Klinovitskaya I. M., Shibayev M. A., Karaulov A. K. Funding of activities of state veterinary services of Russian Federation subjects. *Veterinary Science Today*. 2021; (2): 159–165. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-2-37-159-165.

7. Komar O. N. Statistical analysis of wages in the type of economic activity "Education". *Baltic Economic Journal*. 2022; 2 (38): 11–21. DOI: 10.46845/2073-3364-2022-0-2-11-21. (in Russ.)

8. Samaya rasprostrannaya zarplata v Rossii i naskol'ko ona nizhe sredney? Pochemu u 70% lyudei zarplata nizhe srednego urovnya? = The most common salary in Russia, and how far below average is it? Why is the salary of 70% of people lower than the average? Available at: <https://vc.ru/finance/128505-samaya-rasprostrannaya-zarplata-v-rossii-i-naskolko-ona-nizhe-sredney-pochemu-u-70-lyudey-zarplata-nizhe-srednego-urovnya> (date of access: 10.11.2022). (in Russ.)

9. Statistics: a textbook. Ed. by I. I. Yeliseyeva. Moscow: VITREM; 2010. 443 p. (in Russ.)

10. Danilov D. Mediannaya zarplata v Rossii 2021: razmery po regionam, otraslyam i godam = Median salary in Russia in 2021: levels by region, sector and year. Available at: <https://top-rf.ru/investitsii/513-zarplata.html> (date of access 11.11.2022). (in Russ.)

11. O vnesenii izmenenii v otdel'nye zakonodatel'nye akty Rossiiskoi Federatsii: federal'nyi zakon ot 29.12.2020 № 473-FZ = On amendments to certain legislative acts of the Russian Federation: Federal Law of 29.12.2020 No. 473-FZ. Available at: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_372636. (in Russ.)

12. Ob utverzhdenii metodiki rascheta pokazatelya «Mediannaya zarabotnaya plata»: prikaz Rosstata ot 31.12.2020 № 870 = On approval of the calculation method for the indicator "Median salary": Order of the Federal State Statistics Service of 31.12.2020 No. 870. Available at: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_389382. (in Russ.)

13. Kolobova S. V. Minimum wage and median salary in the mechanism of legal regulation of labor remuneration. *Modern Law*. 2021; 2: 60–67. DOI: 10.25799/NL.2021.59.96.009. (in Russ.)

14. O meropriyatiyakh po realizatsii gosudarstvennoi sotsial'noi politiki: ukaz Prezidenta Rossiiskoi Federatsii ot 07.05.2012 № 597 = On activities for implementation of the governmental social policy: Decree of the President of the Russian Federation of 07.05.2012 No. 597. Available at: <http://www.kremlin.ru/acts/bank/35261>. (in Russ.)

15. Ob utverzhdenii gosudarstvennoi programmy Rossiiskoi Federatsii «Razvitie zdoravookhraneniya»: postanovlenie Pravitel'stva RF ot 26.12.2017 № 1640 (s izmeneniyami i dopolneniyami) = On approval of the governmental programme of the Russian Federation "Health development": Decree of the Government of the Russian Federation of 26.12.2017 No. 1640 (as amended and supplemented). Available at: <https://base.garant.ru/71848440>. (in Russ.)

16. O realizatsii pilotnogo proekta v tselyakh utverzhdeniya trebovaniy k sistemam oplaty truda meditsinskikh rabotnikov gosudarstvennykh i munitsipal'nykh uchrezhdenii zdoravookhraneniya: postanovlenie Pravitel'stva RF ot 01.06.2021 № 847 = On implementation of the pilot project for the approval of requirements for remuneration systems for medical workers of state and municipal health care institutions: Decree of the Government of the Russian Federation of 01.06.2021 No. 847. Available at: <http://government.ru/docs/all/134737>. (in Russ.)

17. Edinye rekomendatsii po ustanovleniyu na federal'nom, regional'nom i mestnom urovnyakh sistem oplaty truda rabotnikov gosudarstvennykh i munitsipal'nykh uchrezhdenii na 2020 god: utv. resheniem Rossiiskoi trekhstoronnei komissii po regulirovaniyu sotsial'no-trudovykh otoshenii ot 24.12.2019, protokol № 11 = Uniform recommendations for the establishment of remuneration systems for employees of state and municipal institutions at the federal, regional and local levels for 2020: approved by Decision of the Russian Tripartite Commission for the Regulation of Social and Labour Relations of 24.12.2019, Protocol No. 11. Available at: <https://docs.cntd.ru/document/564110931>. (in Russ.)

18. Edinye rekomendatsii po ustanovleniyu na federal'nom, regional'nom i mestnom urovnyakh sistem oplaty truda rabotnikov

gosudarstvennykh i munitsipal'nykh uchrezhdenii na 2021 god: utv. resheniem Rossiiskoi trekhstoronnei komissii po regulirovaniyu sotsial'no-trudovykh otноshenii ot 29.12.2020, protocol № 13 = Uniform recommendations for the establishment of remuneration systems for employees of state and municipal institutions at the federal, regional and local levels for 2021: approved by Decision of the Russian Tripartite Commission for the Regulation of Social and Labour Relations of 29.12.2020, Protocol No. 13. Available at: <https://docs.cntd.ru/document/573218356>. (in Russ.)

19. Edinye rekomendatsii po ustanovleniyu na federal'nom, regional'nom i mestnom urovnyakh sistem oplaty truda rabotnikov gosudarstvennykh i munitsipal'nykh uchrezhdenii na 2022 god: utv. resheniem Rossiiskoi trekhstoronnei komissii po regulirovaniyu sotsial'no-trudovykh otноshenii ot 23.12.2021, protocol № 11 = Uniform recommendations for the establishment of remuneration systems for employees of state and municipal institutions at the federal, regional and local levels for 2022: approved by Decision of the Russian Tripartite Commission for the Regulation of Social and Labour Relations of 23.12.2021, Protocol No. 11. Available at: <https://docs.cntd.ru/document/727836846>. (in Russ.)

20. Ob utverzhdenii plana meropriyatiy («dorozhnoi karty») po sovershenstvovaniyu sistemy veterinarnoi bezopasnosti Rossiiskoi Federatsii: rasporyazhenie Pravitel'stva RF ot 07.12.2022 № 3789-p = On approval of the action plan ("road map") for the improvement of the Russian Federation veterinary safety system: Ordinance of the Government of the Russian Federation of 07.12.2022 No. 3789-p. Available at: <https://www.zakonrf.info/rasporyazhenie-pravitel'stvo-rf-3789-r-07122022>. (in Russ.)

21. Itogi federal'nogo statisticheskogo nablyudeniya v sfere oplaty truda otдел'nykh kategorii rabotnikov sotsial'noi sfery i nauki za yan-

var' – dekabr' 2021 goda = The results of the federal statistical survey in the field of remuneration for specific categories of workers of social and scientific sectors for January – December 2021. Available at: <https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/itog-monitor04-21.htm>. (in Russ.)

22. Ob utverzhdenii Veterinarnykh pravil provedeniya regionalizatsii territorii Rossiiskoi Federatsii: prikaz MSKh RF ot 14.12.2015 № 635 = On approval of the Veterinary Rules for implementation of regionalization of the Russian Federation territory: Order of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation of 14.12.2015 No. 635. Available at: <https://docs.cntd.ru/document/420325658>. (in Russ.)

23. O vnesenii izmenenii v perechen' zaraznykh boleznei zhivotnykh, po kotorym provoditsya regionalizatsiya territorii Rossiiskoi Federatsii, prilagaemyi k Veterinarnym pravilam provedeniya regionalizatsii territorii Rossiiskoi Federatsii, utverzhennym prikazom Minsel'khoza Rossii ot 14 dekabrya 2015 g. № 635: prikaz MSKh RF ot 08.12.2020 № 735 = On amendments to the list of contagious animal diseases, with respect to which regionalization of the Russian Federation territory is implemented, annexed to the Veterinary Rules for implementation of regionalization of the Russian Federation territory approved by Order of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation of 14 December 2015 No. 635: Order of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation of 08.12.2020 No. 735. Available at: <https://docs.cntd.ru/document/573339097>. (in Russ.)

Поступила в редакцию / Received 13.02.2023

Поступила после рецензирования / Revised 30.03.2023

Принята к публикации / Accepted 05.04.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Клиновская Ирина Михайловна, кандидат экономических наук, старший научный сотрудник информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-5347-8620>, e-mail: klinovskaya@arriah.ru.

Шибяев Михаил Александрович, кандидат ветеринарных наук, заведующий сектором информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-9382-0109>, e-mail: shibaev@arriah.ru.

Караулов Антон Константинович, кандидат ветеринарных наук, руководитель информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-5731-5762>, e-mail: karaulov@arriah.ru.

Селянин Аркадий Михайлович, директор ГБУ «Владимирская областная СББЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-1200-4597>, e-mail: selyanin.arckady@yandex.ru.

Irina M. Klinovskaya, Candidate of Science (Economics), Senior Researcher, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-5347-8620>, e-mail: klinovskaya@arriah.ru.

Mikhail A. Shibayev, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Sector, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-9382-0109>, e-mail: shibaev@arriah.ru.

Anton K. Karaulov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-5731-5762>, e-mail: karaulov@arriah.ru.

Arkady M. Selyanin, Director, GBI "Vladimir Oblast Animal Disease Control Station", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-1200-4597>, e-mail: selyanin.arckady@yandex.ru.

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 желания 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.



ФГБУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ
ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»
FGBI "FEDERAL CENTRE FOR ANIMAL HEALTH" (FGBI "ARRIAH")

РЕФЕРЕНТНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ ВОЖЖ ПО ЯЩУРУ
WOAH REFERENCE LABORATORY FOR FOOT AND MOUTH DISEASE

РЕФЕРЕНТНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ ВОЖЖ ПО ГРИППУ ПТИЦ
WOAH REFERENCE LABORATORY FOR AVIAN INFLUENZA

РЕФЕРЕНТНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ ВОЖЖ ПО БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА
WOAH REFERENCE LABORATORY FOR NEWCASTLE DISEASE

ЦЕНТР ВОЖЖ ПО СОТРУДНИЧЕСТВУ В ОБЛАСТИ
ДИАГНОСТИКИ И КОНТРОЛЯ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ
ЖИВОТНЫХ ДЛЯ СТРАН ВОСТОЧНОЙ ЕВРОПЫ,
ЦЕНТРАЛЬНОЙ АЗИИ И ЗАКАВКАЗЬЯ
WOAH COLLABORATING CENTRE FOR DIAGNOSIS AND CONTROL OF VIRAL
ANIMAL DISEASES IN EASTERN EUROPE, CENTRAL ASIA AND TRANSCAUCASIA

РЕФЕРЕНТНЫЙ ЦЕНТР ФАО ПО ЯЩУРУ
FAO REFERENCE CENTRE FOR FOOT-AND-MOUTH DISEASE

РЕФЕРЕНТНЫЙ ЦЕНТР ФАО ПО ЗООНОЗНЫМ
КОРОНАВИРУСАМ
FAO REFERENCE CENTRE FOR ZOO NOTIC CORONAVIRUSES

Вакцина против респираторного микоплазмоза и инфекционного синовита птиц ассоциированная инактивированная эмульсионная «ВНИИЗЖ-Бимивак»

Вакцина предназначена для профилактики респираторного микоплазмоза и инфекционного синовита птиц в благополучных, угрожаемых и неблагополучных по заболеваниям птицеводческих хозяйствах.

Иммунизации подлежит птица с 30-суточного возраста. Вакцину вводят однократно в объеме 0,5 см³ подкожно в среднюю треть шеи.

Вакцина вызывает формирование иммунного ответа у кур к возбудителям респираторного микоплазмоза и инфекционного синовита птиц через 21 сут после однократного применения продолжительностью не менее 9 мес. Вакцинацию считают успешной, если не менее чем у 80% привитых цыплят титры антител к *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma synoviae* в сыворотках крови, исследуемых методом иммуноферментного анализа, составляют не менее двух минимальных положительных значений, предусмотренных инструкцией по применению используемого диагностического набора. При получении неудовлетворительных результатов птицу ревакцинируют с последующим контролем напряженности иммунитета.

Вакцина расфасована по 200 см³ (400 прививных доз) в стерильные пластиковые флаконы. Вакцину хранят и транспортируют в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

Срок годности – 18 мес.

Вакцина против инфекционной бурсальной болезни и реовирусного теносиновита птиц инактивированная эмульсионная «ВНИИЗЖ-ИББ+РЕО»

Вакцина предназначена для профилактики инфекционной бурсальной болезни и реовирусного теносиновита птиц в племенных и товарных птицеводческих хозяйствах различного направления выращивания.

Вакцинация подлежат куры в возрасте 80–120 сут, но не позднее чем за месяц до начала яйцекладки. Вакцину вводят однократно в объеме 0,5 см³ подкожно в среднюю треть шеи или внутримышечно в область грудной мышцы.

Вакцина вызывает формирование иммунного ответа к возбудителям инфекционной бурсальной болезни и реовирусного теносиновита птиц через 28 сут после однократного применения, иммунитет сохраняется в течение 12 мес. Вакцинацию считают успешной, если не менее чем у 80% привитых птиц средний титр антител к вирусу инфекционной бурсальной болезни и реовирусного теносиновита птиц в сыворотках крови, исследуемых методом иммуноферментного анализа, в два и более раза превышает минимальное положительное значение, предусмотренное инструкцией по применению используемого диагностического набора.

Вакцина расфасована по 100 см³ (200 доз), 200 см³ (400 доз) и 500 см³ (1000 доз) в пластиковые флаконы. Вакцину хранят и транспортируют в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

Срок годности – 18 мес.

Вакцина против чумы плотоядных, парвовирусного и коронавирального энтеритов, аденовирусной инфекции собак «Карникан-4»

Вакцина предназначена для профилактики чумы плотоядных, парвовирусного и коронавирального энтеритов, аденовирусной инфекции у собак.

Вакцину вводят внутримышечно или подкожно в дозе 1,0 см³ щенкам с 8–10-недельного возраста двукратно с интервалом в 21 сут. За 10 дней до первой вакцинации необходимо провести дегельминтизацию животных.

Ревакцинацию животных проводят один раз в год однократно одной дозой вакцины. Взрослых, ранее не иммунизированных собак вакцинируют двукратно с интервалом в 21 сут.

Вакцина вызывает формирование иммунного ответа у вакцинированных собак к возбудителям чумы плотоядных, парвовирусного и коронавирального энтеритов собак, аденовирусной инфекции собак через 14 сут после двукратного введения продолжительностью не менее 12 мес.

Лекарственная форма: лиофилизированный компонент (живая вакцина) – лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций; жидкий компонент (инактивированная вакцина) – суспензия для инъекций. Лيوфилизированный и жидкий компоненты вакцины расфасованы по одной прививной дозе (по 1,0 см³) в стерильные стеклянные флаконы. Вакцину хранят и транспортируют в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

Срок годности – 12 мес.

