

ВЕТЕРИНАРИЯ



**Зрелое
решение**

Доксатиб®
доксациклин

Порошок для орального применения 500 мг/г



- Высокая растворимость благодаря особой формуле наполнителя на основе винной кислоты¹
- Улучшенная стабильность в маточных растворах и питьевой воде¹
- Снижение обрастания систем поения биопленкой за счет безлактозного наполнителя²

Калькулятор для быстрого
и простого расчета дозы



krkaVetExpert.ru

Источники информации: 1. Parvathy VS, Talwar C. The oxytetracycline oral powder as antibacterial agent in water in Aquacultural agents. Filed by Bharatida V. 2012, p. 300.
2. Baidya H, Hori A, Katsura H, B. Maruya E, Smith H. Katsura, a calcium pyrophosphate, nanofiber with Pseudomonas aeruginosa bioburden and the efficacy of biofouling. Poster session presented at International Conference 2013 AAPG Annual Meeting and Exposition 2013, 2013 Nov 04, San Antonio, TX.

Заказчики размещения рекламы ООО «КРКА ФАРМА»

125212, г. Москва, Головинское шоссе, дом 5, корпус 1

Тел.: (495) 981 1055, факс: (495) 981 1091

E-mail: info.ru@krka.biz, www.krka.ru

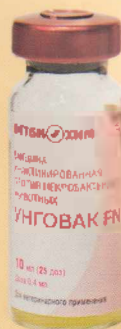
Для специалистов в области ветеринарии, осуществляющих фармацевтическую деятельность



6.2025 18+

ВАКЦИНЫ ДЛЯ НАДЕЖНОЙ ЗАЩИТЫ ОТ ЭКОНОМИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ КРС

ВАКЦИНА ПРОТИВ
НЕКРОБАКТЕРИОЗА
УНГОВАК FN



СЕРИЯ ВАКЦИН
ПРОТИВ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ
КОМБОВАК

ВАКЦИНА ПРОТИВ
КЛОСТРИДИОЗОВ
КЛОСТБОВАК 8



www.vetbio.ru

info@vetbio.ru

+7 (495) 640-1714, +7 (800) 777-9814



ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ
УЧРЕЖДЕН МИНИСТЕРСТВОМ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И АНО «РЕДАКЦИЯ ЖУРНАЛА
"ВЕТЕРИНАРИЯ"»

ЖУРНАЛ ОСНОВАН В МАЕ 1924 г. МОСКВА

В НОМЕРЕ

- 3 Готов А.Г., Глотова Т.И. Коронавирусная инфекция крупного рогатого скота: особенности клинического проявления, патогенеза и молекулярной эпизоотологии (обзор)

ПРАКТИКА: ОПЫТ, ПРОБЛЕМЫ, ПЕРСПЕКТИВЫ

- 10 Раицкая В.И. Кормовая добавка Афлуксид при желудочно-кишечных болезнях поросят

ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

- 14 Козырева Н.Г. Количественный анализ ДНК на фоне полиморфизма возбудителя при лейкозе крупного рогатого скота
- 20 Гулюкина Е.М. Гистологическое исследование печени куриных эмбрионов, зараженных аденовирусом птиц
- 24 Власов М.Е., Чадаева А.А., Синдрякова И.П., Колбасова О.Л., Поволяева О.С., Юрков С.Г. Культуральные свойства и молекулярно-генетическая характеристика штамма «ЭС-95» парвовируса собак

ИНВАЗИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

- 32 Алексеенкова С.В., Стаффорд В.В., Лощинин М.Н. Характеристика культивируемого штамма *Trypanosoma equiperdum*
- 39 Гулюкин Е.А., Арисов М.В. Цифровые технологии в области идентификации иксодовых клещей

ФАРМАКОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ

- 45 Василевич Ф.И., Бачинская В.М., Шарапова Н.Р., Гурьева В.И. Эффективность пробиотической кормовой добавки для профилактики кишечных инфекций у мышей
- 50 Присный А.А., Сворцов В.Н., Степанова Т.В., Гребцова Е.А. Морфометрические показатели эритроцитов утят под действием ципрофлоксацина в условиях экспериментальной стафилококковой инфекции и осмотической нагрузки

ЛАБОРАТОРНАЯ ПРАКТИКА

- 55 Тюрин Е.А. Соблюдение требований биологической безопасности в ветеринарных испытательных лабораториях при проведении работ с ПБА II – IV групп
- 61 Никитина Н.В., Трубицын М.М. Основы сублимационной сушки живых вакцин

IN THE ISSUE

- 3 **Glotov A.G., Glotova T.I.** Coronavirus infection in cattle: features of clinical manifestation, pathogenesis and molecular epizootology (review)

EXPERIMENT, PROBLEMS, PERSPECTIVES

- 10 **Raitskaya V.I.** Use of Afluxide in gastrointestinal diseases of piglets

INFECTIOUS DISEASES

- 14 **Kozyreva N.G.** Relative quantitative characteristics of field isolates of BLV with different genetic status in bovine leukemia
- 20 **Guliukina E.M.** Histological examination of the liver of chicken embryos infected with avian adenovirus
- 24 **Vlasov M.E., Chadaeva A.A., Sindryakova I.P., Kolbasova O.L., Povolayaeva O.S., Yurkov S.G.** Cultural properties and molecular genetic characteristics of the strain "ES-95" of canine parvovirus

INVASIVE DISEASES

- 32 **Alexeyenkova S.V., Stafford V.V., Loschinin M.N.** Characteristic of *Trypanosoma equiperdum* strain
- 39 **Gulyukin E.A., Arisov M.V.** Digital technologies in the field of tick identification

PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY

- 45 **Vasilevich F.I., Bachinskaya V.M., Sharapova N.R., Guryeva V.I.** The effectiveness of probiotic feed additives for the prevention of intestinal infections in mice
- 50 **Prisnyi A.A., Skvortsov V.N., Stepanova T.V., Grebtsova E.A.** Morphometric parameters of ducklings' erythrocytes under the influence of ciprofloxacin in conditions of experimental staphylococcal infection and osmotic load

LABORATORY PRACTICE

- 55 **Tyurin E.A.** Compliance with biological safety requirements in veterinary testing laboratories when working with PBA groups II – IV
- 61 **Nikitina N.V., Trubitsyn M.M.** Basics of freeze-drying live vaccines

Главный редактор
Т.В. СТОЛЛЯР

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

А.Н. Панин, д.в.н., профессор,
академик РАН – председатель
Ф.И. Василевич, д.в.н., профессор,
академик РАН
М.И. Гулюкин, д.в.н., профессор,
академик РАН
С.В. Енгашев, д.в.н., профессор,
академик РАН
Е.А. Непоклонов, д.б.н., профессор
И.Г. Серегин, к.в.н., профессор
А.М. Смирнов, д.в.н., профессор,
академик РАН
А.А. Стекольников, д.в.н., профессор,
академик РАН
А.В. Успенский, д.в.н., профессор,
член-корреспондент РАН
Б.В. Уша, д.в.н., профессор,
академик РАН
Ю.Н. Федоров, д.б.н., профессор,
член-корреспондент РАН

Редакторы
Т.В. Столляр,
А.Т. Столляр

Художественное и техническое
редактирование
Е.В. Апраксина

Подписано к печати 25.05.2025.
Формат 70х100 1/16.
Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 5,2.
Заказ 25-0225.

Адрес редакции журнала «Ветеринария»:
109428, Москва,
Рязанский проспект, д. 24, корп. 1.
e-mail: anovet24@yandex.ru
www.journalveterinariya.ru

Адрес издателя –
АНО «Редакция журнала «Ветеринария»:
109428, Москва,
Рязанский проспект, д. 24, корп. 1.

С предложениями
о размещении
РЕКЛАМЫ
e-mail: anovet24@yandex.ru

Редакция не несет ответственности
за содержание рекламных объявлений.
При перепечатке ссылка на журнал
«Ветеринария» обязательна.

Отпечатано в типографии
ООО «Типография»
Кантемировская ул., д. 60
типография.moscow

"VETERINARY MEDICINE JOURNAL" printed in over 4 thousand copies and having subscribers in more than 40 countries worldwide, publishes advertisements at contractual prices.

For suggestions, please contact: "Veterinariya" journal,
Vologogradskiy prospectus, 2, Moscow, 109316, Russia.
Tel: 8 (495) 730 37 99.

КОРОНАВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА: ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ПРОЯВЛЕНИЯ, ПАТОГЕНЕЗА И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЭПИЗООТОЛОГИИ (обзор)

Александр Гаврилович Глотов, д.в.н., заведующий лабораторией, профессор, glotov_vet@mail.ru

Татьяна Ивановна Глотова, д.б.н., главный научный сотрудник, профессор, t-glotova@mail.ru

ФГБУН Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН (СФНЦА РАН),

Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока

(пос. Краснообск, Новосибирская обл., Россия)

В обзоре кратко обобщены литературные данные об особенностях клинического проявления, патогенеза и молекулярной эпизоотологии коронавирусной инфекции крупного рогатого скота. Болезнь распространена повсеместно. Вирус является причиной нескольких клинических синдромов: диарея новорожденных телят, заболевания дыхательных путей у молочных телят и откормочного скота, а также зимняя дизентерия у взрослых животных. Антигенных и генетических различий между кишечными и респираторными штаммами не установлено. Существует корреляция выделения вирусов с географической локацией, но не с клинической формой болезни. На основании секвенс генов S и N установлено существование двух независимых генетических кластеров: европейского и американо-азиатского. Приводятся литературные данные о молекулярной эпизоотологии болезни в мире, в том числе Сибири. Мониторинг распространения генетических вариантов вируса в конкретном регионе важен для оптимизации профилактических мер и выработки стратегии борьбы с коронавирусной инфекцией крупного рогатого скота. **Ключевые слова:** крупный рогатый скот, коронавирусы, клинические проявления, патогенез, молекулярная эпизоотология.

Coronavirus infection in cattle: features of clinical manifestation, pathogenesis and molecular epidemiology (review)

A.G. Glotov, PhD in Veterinary Science, Professor, Head of laboratory, glotov_vet@mail.ru

T.I. Glotova, PhD in Biology, Professor, Chief researcher, t-glotova@mail.ru

Siberian Federal Research Center for Agro-BioTechnologies RAS,

Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East

The review briefly summarizes the literature data on the clinical manifestations, pathogenesis and molecular epidemiology of coronavirus infection in cattle. The infection is widespread. The virus causes several clinical syndromes: diarrhea in newborn calves, respiratory diseases in dairy calves and fattened cattle, and winter dysentery in adult animals. No antigenic and genetic differences have been established between intestinal and respiratory strains. There is a correlation between virus isolation and geographic location, but not with the clinical form of the disease. Based on the S and N gene sequence, the existence of two independent genetic clusters has been established: European and American-Asian. Literature data on the molecular epidemiology of the disease in the world, including Siberia, are provided. Monitoring the spread of genetic variants of the virus in a particular region is important for optimizing preventive measures and developing a strategy to combat coronavirus infection in cattle. **Key words:** cattle, coronaviruses, clinical manifestations, pathogenesis, molecular epidemiology.

DOI:10.30896/0042-4846.2025.28.6.03-08

Коронавирусы (BCoV) широко распространены в популяции крупного рогатого скота и являются причиной диареи у новорожденного молодняка, заболеваний дыхательных путей у молочных телят и откормочного скота, а также зимней дизентерии у взрослых животных, приводя к значительным экономическим потерям в промышленном животноводстве [1 – 4, 7 – 9, 17, 27]. Они принадлежат к группе быстроразвивающихся вирусов, для которых характер-

но постоянное возникновение новых вариантов. Эта пластичность позволяет им адаптироваться к различным тканям и хозяевам, избегать иммунного ответа хозяина и даже преодолевать межвидовые барьеры [14, 27].

Цель данного обзора – краткое обобщение литературных данных об особенностях клинического проявления, патогенеза и молекулярной эпизоотологии коронавирусной инфекции крупного рогатого скота.

Возбудитель. Коронавирус крупного рогатого скота (Bovine coronavirus, BCoV) принадлежит к порядку *Nidovirales*, семейству *Coronaviridae*, роду *Betacoronavirus-1* [16]. Геном представлен одноцепочечной положительно заряженной РНК размером около 32 Kb и включает 10 открытых рамок считывания (ORF), фланкированных 5'- и 3'-нетранслируемыми областями [25]. Это оболочечный вирус диаметром примерно 100 – 120 нм с пятью структурными белками: (S) шиповидный гликопротеин; (M) интегральный мембранный белок; (HE) гликопротеин гемагглютинин-эстераза; (E) малый мембранный белок и (N) нуклеокапсидный фосфопротеин [20].

Белок N выполняет функции, связанные с вирусным патогенезом, транскрипцией и репликацией. Он высоко консервативен, поэтому его часто используют для молекулярной диагностики и секвенирования [27]. Гликопротеин S отвечает за прикрепление вируса к клеткам-мишеням и его слияние с клеточной мембраной. Ген этого белка менее консервативен, подвергается селективному прессингу со стороны иммунной системы, что используется вирусом для «уклонения» от иммунного ответа организма, но также пригоден в качестве мишени для молекулярного анализа. Несмотря на некоторые различия между кишечными и респираторными изолятами, до сих пор не выявлены антигенные и генетические маркеры, позволяющие различать их между собой [18].

Патогенез

и клинические формы инфекции

Коронавирусная диарея новорожденных телят. Вирус впервые был выделен в 1973 г. (штамм Mebus). Агент вызывает диарею у телят в возрасте от одной до трех недель, при отсутствии или низких титрах колостральных антител. После инкубационного перио-

да 3 – 4 дня у них развивается тяжелая диарея длительностью от 2 до 8 дней, приводящая к обезвоживанию и гибели. Тяжесть болезни зависит от дозы BCoV, возраста теленка и его иммунного статуса. Заболеваемость новорожденных телят может достигать 100 %, а летальность – 50 % [4, 7, 8, 21].

Вирус поражает эпителиальные клетки дистальных отделов тонкой и толстой кишки, что приводит к атрофии ворсинок и гиперплазии крипт. В тяжелых случаях поражения могут распространяться на двенадцатиперстную, тощую, подвздошную, слепую, толстую и прямую кишку [24, 28]. Диарея с нарушением всасывания (мальабсорбции) обуславливает прогрессирующее обезвоживание, ацидоз, гиперкалиемию и гипогликемию, сопровождающиеся недостаточностью кровообращения и гибелью животного. Кишечные штаммы вируса вызывают диарею, но потенциально являются респираторными, пневмонии наблюдают у 20 – 30 % переболевших телят. Заболевание чаще регистрируют зимой, вероятно, из-за устойчивости вируса к низким температурам. Вспышки происходят ежегодно на одной и той же ферме. В пределах стада резервуарами инфекции могут быть клинически или субклинически инфицированные телята или коровы [24, 28].

Микроскопически в пораженных брыжеечных лимфатических узлах выявляют умеренное истощение кортикальных фолликулов или их некроз. Регистрируют васкулит брыжеечных сосудов из-за притока фибрина, нейтрофилов, лимфоцитов, гистиоцитов и плазматических клеток, атрофию ворсинок тонкого кишечника, увеличение глубины крипт. В толстом кишечнике – признаки острого геморрагического колита. Иногда отмечают язвы слизистой оболочки с отложением фи-

брина, некроз крипт и атрофию желез толстой кишки [26, 29].

Зимняя коронавирусная дизентерия взрослых животных (ЗКД) – острая болезнь мясного и молочного скота, протекающая с симптомами диареи и возникающая в основном в зимнее время (ноябрь–март) [29]. Встречается во всем мире. Серопревалентность к вирусу среди взрослых особей высокая [19]. Описаны вспышки ее у взрослого молочного скота и у телят от 6 до 9 месяцев. Заболеваемость от 50 до 100 %, но летальность при неосложненных случаях низкая (1 – 2 %). Вирус выделяется с фекалиями больных животных. Его впервые изолировали в культуре клеток от животных с признаками ЗКД в 1990 г. [21]. Штаммы вируса, выделенные при вспышках ЗКД, проявляют тесное антигенное родство с таковыми, изолированными при других клинических синдромах коронавирусной инфекции [19, 20]. Зимняя дизентерия – острое заболевание, характеризующееся геморрагической диареей, частыми респираторными симптомами, анорексией и транзитным снижением молочной продуктивности у коров [24]. Кишечные поражения и инфицированные BCoV клетки в крипах толстой кишки крупного рогатого скота напоминают таковые при диарее телят, но с обширным некрозом крипт толстой кишки и кровотечением [7, 21, 28]. Факторы, связанные с проявлениями заболевания, – сильная кровавая диарея, предрасположенность взрослого скота и зимнее распространение – до сих пор не выявлены [29].

Респираторная инфекция телят в молочных и мясных стадах встречается во всем мире и проявляется в виде ринита, кашля или пневмонии у телят в возрасте 2 – 6 месяцев после снижения титров колостральных антител ниже защитного уровня [12]. Вирус присутству-

ет в носовых выделениях и фекалиях больных животных. Зарегистрировано фекальное и назальное выделение респираторного штамма вируса новорожденными телятами до 20-недельного возраста [22]. Первоначальной формой болезни может быть диарея, переходящая в респираторную форму. Выделение вируса с носовыми секретами носит прерывистый характер в связи с повторными заражениями. Долговременный иммунитет слизистых оболочек верхних дыхательных путей у телят после естественной респираторной инфекции отсутствует [29].

Резервуарами возбудителя могут быть субклинически, клинически больные телята или телки старших возрастов, у которых размножение вируса происходит циклично, сопровождаясь его выделением из носа. Циркуляция возможна и среди взрослых животных при субклиническом течении инфекции. Способ передачи респираторных штаммов в молочных стадах, как правило, фекально-оральный, воздушно-капельный менее важен [21].

При вскрытии патологические изменения регистрируют примерно у 30 % особей в виде пневмонии, перикардита и плеврита. Они могут варьировать от многоочаговых, сливающихся областей консолидации в вентральной части легких до подострой экссудативной и некротической долевой пневмонии, охватывающей от 50 до 80 % ткани легких при вторичных бактериальных инфекциях. Спайки встречаются редко, но фибриновые метки на грудной плевре отмечают у 40 % животных с поражениями легких. На слизистой оболочке трахеи выявляют петехии и различное количество слизисто-гнойных выделений, которые также могут присутствовать в просветах бронхов [12, 21, 27, 29].

Респираторную коронавирусную инфекцию мясных быков на откорме (фидлотах) в возрасте от 6 до 10 месяцев изучают с 1995 г. в связи с возросшей ролью вируса в этиологии массовых респираторных болезней («транспортной лихорадки») и снижением показателей роста и привесов у животных [25]. Клинические признаки схожи с таковыми респираторной болезни у молочных телят. Предполагают, что возникновение этой формы инфекции в естественных условиях инициируется инфекцией BCoV по прибытии животных на фидлот, за которой следуют другие вирусы и респираторные бактерии (*Mannheimia haemolytica* и *Pasteurella multocida*) [26].

Поражения могут включать некротическую пневмонию, интерстициальную эмфизему, бронхиолит и альвеолит, некроз респираторного эпителия и негнойную воспалительную клеточную инфильтрацию в слизистую оболочку в сочетании с бактериальной инфекцией. На вскрытии обычно регистрируют трахеальные петехии со слизисто-гнойными выделениями и бронхоинтерстициальную пневмонию с интрабронхиальными синцитиальными клетками [26, 29]. Наблюдают некроз эпителиальных клеток в носовых раковинах, трахее, бронхиолах и легочной паренхиме с сопутствующей интерстициальной пневмонией и гиперплазией пневмоцитов II типа. Синцитии ограничиваются бронхиолами [21, 27, 28].

Молекулярная эпизоотология. Все исследованные изоляты BCoV, независимо от клинического происхождения, принадлежат к одному серотипу/генотипу, но с двумя-тремя подтипами [21]. Изучение гетерогенности изолятов и штаммов вируса в основном проводят по генам S и N [11, 12, 14].

Оценка географического распространения вируса свидетельствует о двух

независимых генетических кластерах: европейском и американо-азиатском [12, 14, 22]. Считают, что предок BCoV появился в 1940-х годах в США и две географически разные линии разошлись в 1960 – 1970-х годах, при интенсификации международной торговли скотом [22].

Филогеографический анализ показал, что на территории Южной Кореи, Америки и Аргентины циркулируют изоляты, близкие к американской и европейской ветвям [11]. Бразильские изоляты вируса, на основе анализа гена N разделились на два отдельных кластера, они тесно связаны с азиатскими штаммами [13]. Уругвайские штаммы сгруппировались в две разные линии: одна с аргентинскими штаммами, а другая – с бразильскими. Предполагают, что обе эти линии BCoV проникли в Уругвай в 2013 г., одна из Бразилии, а другая – из Аргентины. Линии различаются между собой по четырем аминокислотным заменам, и обе отличаются от эталонного штамма Mebus [11]. Ирландские штаммы, на основе данных секвенирования по гену S, отнесены к европейской группе вирусов [15].

Иранские изоляты и штаммы находились полностью в независимых кластерах и не проявляли родства с таковыми, выделенными в других странах. Однако они показали некоторое сходство со штаммами, обнаруженными во Франции, Хорватии, Дании и Швеции [19]. Турецкие штаммы вируса, изолированные от животных из нескольких отдаленных друг от друга ферм, были близки к штаммам из Европы [23].

Анализ японских изолятов коронавируса крупного рогатого скота по последовательности участка гена S показал наличие 4 генетических кластеров. Правые изоляты относились к «классическим» американским штаммам Mebus и

Quebec и классифицировались по годам выделения и хозяйствам, где они были изолированы независимо от клинических симптомов болезни [10].

В Китае характер проявления инфекции был связан с типом ведения животноводства, возрастом и плотностью размещения скота. Все исследованные штаммы генетически отличались от эталонных штаммов из Южной Кореи и Европы. Их отнесли к группе Азия-Северная Америка, а один штамм – к Европейской группе. Была зафиксирована рекомбинация между двумя разными штаммами, что привело к образованию рекомбинантного штамма BCoV-AKS-01 [30].

Практически все авторы отмечали наличие корреляции выделения вирусов с географической локацией, но не с формой болезни.

Сибирская популяция коронавируса носит смешанный характер. На основе гена S изоляты разделились на две клады с двумя подкладами в каждой. В первую подкладу (европейская линия) вошли 11 изолятов. Во второй кладе в первой подкладе (американо-азиатская линия) оказались 6, а во второй подкладе (смешанная линия) – один изолят. На основе гена N получили две клады, одна из них включала две подклады. В первую подкладу отнесли 3 изолята (американо-азиатская линия), а во вторую – один (смешанная). Во второй кладе (смешанная) оказались 8. Различий между диарейными и респираторными изолятами, а также в зависимости от их географического местоположения не установили [5].

Заключение. Коронавирусная инфекция крупного рогатого скота широко распространена во всем мире, в том числе и в Российской Федерации. Встречаются все описанные в литературе клинические формы болезни. В настоящее время актуальны исследования,

учение механизмов передачи вирусов и их тропизма к органам и тканям животных, объясняющие возникновение различных клинических форм инфекции. Важным является понимание факторов, влияющих на возникновение различных генетических вариантов вирусов, и их взаимодействие с факторами защиты организма животных, что определяет патогенез и механизмы инфекции. Мониторинг распространения генетических вариантов вируса в конкретном регионе необходим для оптимизации профилактических мер и выработки стратегии борьбы с коронавирусной инфекцией крупного рогатого скота.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алипер Т.И., Saif L.J., Панин А.Н., Гулюкин М.И., Орлянкин Б.Г., Власова А.Н. и др. Актуальные инфекционные болезни крупного рогатого скота. Рук. водство. М., 2021; 232 с. DOI:10.31016/viev-2021-6
2. Батомункуев П., Евдокимов И. Рота- и коронавирусные инфекции крупного рогатого скота. Ветеринария сельскохозяйственных животных. 2020; 5:9 – 13.
3. Беспалова Т.Ю., Блохин А.А. Коронавирусы животных (Обзор). Ветеринария. 2020; 9:3 – 10. DOI:10.30896/0042-4846.2020.23.9.03-107-11
4. Глов А.Г., Глово Т.И. Коронавирусы жвачных животных. Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2020; 50(3):49 – 61. DOI: 10.26898/0370-8799-2020-3-5
5. Глов А.Г., Нефедченко А.В., Южаков А.Г., Котенева С.В., Глово Т.И., Комина А.К., Красников Н.Ю. Генетический полиморфизм сибирских изолятов коронавируса крупного рогатого скота (Coronaviridae: Betacoronavirus-1: Bovine-Like coronaviruses). Вопросы вирусологии. 2022; 67(6):7 – 16. DOI:10.36233/0507-4088-141
6. Котенева С.В., Глово Т.И., Нефедченко А.В., Глов А.Г. Вспышка коронавирусной инфекции с респираторным синдромом у телят на молочном комплексе. Ветеринария. 2023; 1:17 – 23. DOI:10.30896/0042-4846.2023.26.1.16-23
7. Мищенко В.А., Думова В.В., Черных О.Ю., Киселев М.Ю., Мищенко А.В., Бакунов И.Н., Кононов А.В. Распространение коронавируса крупного рогатого скота у жвачных животных. Ветеринария. 2010; 9:18 – 21.

8. Нефедченко А.В., Котенева С.В., Глотова Т.И., Готов А.Г. Роль коронавируса в этиологии желудочно-кишечной и респираторной патологии телят на молочных комплексах. Ветеринария. 2022; 1:18 – 23 DOI:10.30896/0042-4846.2022.25.01.18-23
9. Орлянкин Б.Г., Власова А.Н., Мухин А.Н., Алипер Т.И. Коронавирусные инфекции животных: эпизоотология и патогенез. Ветеринария. 2022; 3: 3 – 13. DOI:10.30896/0042-4846.2022.25.03.13
10. Amicone M., Borges V., Alves M.J., Isidro J. et al. Mutation rate of SARS-CoV-2 and emergence of mutators during experimental evolution. *Evol. Med. Public Health*. 2022; 10(1):142 – 155. DOI:10.1093/emph/eoac010
11. Bok M., Miño S., Rodriguez D., Badaracco A. et al. Molecular and antigenic characterization of bovine Coronavirus circulating in Argentinean cattle during 1994–2010. *Veterinary Microbiology*. 2015; 3 – 4(181):221 – 229. DOI:10.1016/j.vetmic.2015.10.017
12. Colina S.E., Serena M.S., Echeverria M.G., Metz G.E. Clinical and molecular aspects of veterinary coronaviruses. *Virus Res*. 2021; 297:198382. DOI: 10.1016/j.virusres.2021.198382
13. De Mira Fernandes A., Brandão P.E., Dos Santos Lima M., de Souza Nunes Martins M. et al. Genetic diversity of BCoV in Brazilian cattle herds. *Vet. Med. Sci*. 2018; 4(3):183 – 189. DOI:10.1002/vms.3.102
14. Franzo G., Drigo M., Legnardi M., Grassi L. et al. Bovine Coronavirus: Variability, Evolution, and Dispersal Patterns of a No Longer Neglected Betacoronavirus. *Viruses*. 2020; 12(11):1285. DOI: 10.3390/v12111285
15. Gunn L., Collins P.J., O'Connell M.J., O'Shea H. Phylogenetic investigation of enteric bovine coronavirus in Ireland reveals partitioning between European and global strains. *Irish Veterinary Journal*. 2015; 1(68):31. DOI: 10.1186/s13620-015-0060-33
16. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) New MSL including all taxonomy updates since the 2018b release Updates approved during EC 51, Berlin, Germany, 2019. <https://ictv.global>
17. Islam A., Ferdous J., Islam S., Sayeed M.A. et al. Evolutionary Dynamics and Epidemiology of Endemic and Emerging Coronaviruses in Humans, Domestic Animals, and Wildlife. *Viruses*. 2021;13(10):1908. DOI:10.3390/v13101908
18. Liu X., Wu Q., Zhang Z. Global Diversification and Distribution of Coronaviruses with Furin Cleavage Sites. *Front Microbiol*. 2021; 12:649314. DOI:10.3389/fmicb.2021.649314
19. Lotfollahzadeh S., Madadgar O., Reza Mohebbi M., Reza Mokhter Dezfouli M., George W.D. Bovine coronavirus in neonatal calf diarrhoea in Iran. *Vet. Med. Sci*. 2020; 6(4):686 – 694. DOI:10.1002/vms.3.277
20. Masters P.S. The Molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res*. 2006; 66:193 – 292. DOI:10.1016/S0065-3527(06)66005-3
21. Saif L.J., Jung K. Comparative Pathogenesis of Bovine and Porcine Respiratory Coronaviruses in the Animal Host Species and SARS-CoV-2 in Humans. *J. Clin. Microbiol*. 2020; 58(8):e01355-20. DOI:10.1128/JCM.01355-20
22. Salem E., Dhanasekaran V., Cassard H., Hause B., Maman S., Meyer G., Ducatez M.F. Global Transmission, Spatial Segregation, and Recombination Determine the Long-Term Evolution and Epidemiology of Bovine Coronaviruses. *Viruses*. 2020; 12(5):534. DOI:10.3390/v12050534
23. Sevinc Temizkan S., Alkan F. Bovine coronavirus infections in Turkey: molecular analysis of the full-length spike gene sequences of viruses from digestive and respiratory infections. *Arch. Virol*. 2021; 166(9):2461 – 2468. DOI:10.1007/s00705-021-05147-2
24. Shi Z.L., Guo D., Rottier P.J. Coronavirus: epidemiology, genome replication and the interactions with their hosts. *Virol. Sin*. 2016; 31(1):1 – 2. DOI:10.1007/s12250-016-3746-0
25. Suzuki T., Otake Y., Uchimoto S., Hasebe A., Goto Y. Genomic Characterization and Phylogenetic Classification of Bovine Coronaviruses Through Whole Genome Sequence Analysis. *Viruses*. 2020; 12(2):183. DOI:10.3390/v12020183
26. Van den Hurk S., Regmi G., Naikare H.K., Velayudhan B.T. Advances in Laboratory Diagnosis of Coronavirus Infections in Cattle. *Pathogens*. 2024;13(7):524. DOI:10.3390/pathogens13070524
27. Vlasova A.N., Saif L.J. Bovine Coronavirus and the Associated Diseases. *Front. Vet. Sci*. 2021; 8:643220. DOI:10.3389/fvets.2021.6432205
28. Weiss S.R., Leibowitz J.L. Coronavirus pathogenesis. *Adv. Virus Res*. 2011; 81:85 – 164. DOI: 10.1016/B978-0-12-385885-6.00009-2
29. Zappulli V., Ferro S., Bonsembiante F., Brocca G. et al. Pathology of Coronavirus Infections: A Review of Lesions in Animals in the One-Health Perspective. *Animals (Basel)*. 2020; 10(12):2377. DOI:10.3390/ani10122377
30. Zhu Q., Su M., Li Z., Wang X. et al. Epidemiological survey and genetic diversity of bovine coronavirus in Northeast China. *Virus Res*. 2022; 308:198632. DOI:10.1016/j.virusres.2021.198632

NOVAMUNE[®]



СТОП

ЦИКЛ БОЛЕЗНИ ГАМБОРО

КОНТРОЛЬ ИНФЕКЦИОННОЙ БУРСАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ,
НАЧИНАЯ С ИНКУБАТОРИИ, ПОЗВОЛИТ ВАМ
ПЕРЕОСМЫСЛИТЬ ПРОГРАММУ ВАКЦИНАЦИИ



ПЕРЕД ПРИМЕНЕНИЕМ ОЗНАКОМЬТЕСЬ С ИНСТРУКЦИЕЙ

УДК 619:616.053.2

КОРМОВАЯ ДОБАВКА АФЛУКСИД ПРИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫХ БОЛЕЗНЯХ ПОРОСЯТ

Валентина Ивановна Раицкая, к.в.н., руководитель группы, v.raitskaya@yandex.ru

Научно-исследовательский институт аграрных проблем Хакасии – филиал ФИЦ КНЦ СО РАН

Лечебная кормовая добавка Афлуксид – эффективное средство лечения поросят с симптомами диареи. Применяли ее молодняку в течение трех дней в дозе 10 г на голову 2 раза в сутки. Наблюдали улучшение морфологического состава крови, сокращение сроков лечения и повышение сохранности поросят до 100%. У всех животных до начала лечения концентрация гемоглобина в крови была ниже физиологической нормы, что свидетельствует о явном недостатке железа, участвующего в синтезе клеток крови в костном мозге. Такой дефицит является следствием диареи и активизации окислительно-восстановительных процессов в организме. После завершения эксперимента (курса лечения) содержание гемоглобина в крови поросят опытной группы возвращалось к норме. Результаты проведенных исследований показали, что Афлуксид – эффективное средство сорбционной терапии, оказывает выраженное антидиарейное действие и играет важную роль в нормализации процессов обмена веществ. Простота в применении, экономическая доступность, быстрый терапевтический эффект позволяют рекомендовать Афлуксид для лечения поросят с признаками диареи. **Ключевые слова:** поросята, препарат Афлуксид, диарея, гематология, биохимия крови.

Use of Afluxide in gastrointestinal diseases of piglets

V.I. Raitskaya, PhD in Veterinary Science, Group leader, v.raitskaya@yandex.ru

Scientific Research Institute of Agrarian Problems of Khakassia – Branch of the Federal Research Center of the KSC SB RAS

The therapeutic feed additive Afluxide is an effective treatment for piglets with symptoms of diarrhea. It was applied to young animals for three days at a dose of 10 g per head 2 times a day. There was an improvement in the morphological composition of the blood, a reduction in the duration of treatment and an increase in the safety of piglets up to 100%. In all animals, before the start of treatment, the concentration of hemoglobin in the blood was below the physiological norm, which indicates a clear lack of iron involved in the synthesis of blood cells in the bone marrow. Such deficiency is a consequence of diarrhea and activation of redox processes in the body. After completion of the experiment (course of treatment), the hemoglobin content in the blood of piglets of the experimental group returned to normal. The results of the conducted studies have shown that Afluxide is an effective means of sorption therapy, has a pronounced antidiarrheal effect and plays an important role in the normalization of metabolic processes. Ease of use, economic accessibility, and rapid therapeutic effect make it possible to recommend Afluxide for the treatment of piglets with signs of diarrhea. **Key words:** piglets, Afluxide drug, diarrhea, hematology, blood biochemistry.

DOI:10.30896/0042-4846.2025.28.6.10-13

Среди желудочно-кишечных болезней молодняка сельскохозяйственных животных особое место занимает диарея (диспепсия) – собирательное название острых желудочно-кишечных патологий, характеризующихся различной тяжестью течения – от легкого расстройства пищеварения до обезвоживания организма, токсикоза и гибели [6]. У животных нарушается кислотно-щелочное равновесие и водно-электролитный баланс, значительно уменьшается концентрация кальция. В таких случаях антибактериальные препараты чаще всего неэффективны, так как микроорганизмы достаточно быстро вырабатывают к ним устойчивость.

Помимо этого, лекарственные препараты влияют на состав симбиотической микрофлоры, обеспечивающей не только нормальный процесс пищеварения, но и конкурентное ингибирование патогенных бактерий [2, 5].

В ООО «Биорост» разработали кормовую добавку Афлуксид на основе смектитовых минералов, которая представляет собой порошок сероватого цвета со слабым запахом ванилина. Добавка существенно дешевле антибактериальных препаратов, к ней не вырабатывается устойчивость, она не оказывает влияния на нормофлору желудочно-кишечного тракта. Афлуксид проявля-

ет антидиарейную активность, легко вписывается в технологию содержания сельскохозяйственных животных и птиц, сокращает время проявления основных клинических признаков диареи, стабилизирует защитный слизистый барьер кишечника [2, 4]. В состав добавки входят: бентонит – 55,0 – 59,0 %, (ионообменная ёмкость – не менее 55 мг-экв/100 г), глюкоза – 29,0 – 32,0 %, цитрат натрия – 4,5 – 6,0 %, натрия хлорид – 2,5 – 4,5 %, калия хлорид – 2,0 – 3,0 %, сахарин натрия – 0,25 – 0,45 % и ванилин – 0,1 – 0,2 %, а также диоктаурический монтмориллонит – минерал с листовидной структурой. Главная особенность монтмориллонита, определяющая его лечебные свойства, – величина и количество частиц, благодаря мельчайшим размерам они создают огромную адсорбционную поверхность (от 80 м² на 1 г) в зависимости от материнской породы, из которой они образовались. Афлуксид также содержит жизненно важные минеральные элементы – кальций, натрий, калий, магний, железо, йод, создающие благоприятную среду для развития и обитания нормальной микрофлоры. Бентонит благодаря адсорбционным свойствам выводит из организма токсические вещества, нарушающие работу пищеварительного тракта [4].

Цель исследований – изучить эффективность кормовой добавки Афлуксид при желудочно-кишечных болезнях поросят в Республике Хакасия.

Материалы и методы. Экспериментальную часть выполнили в ООО «Свинокомплекс «Хакаское подворье» на 20 поросятах-отъемышах в период опоросов свиноматок с марта по май 2024 года. Степень поражения поросят оценивали по шкале выраженности признаков диареи (темноокрашенный водянистый кал, повышение температуры тела в среднем на 1,5 °С, отсутствие аппетита). Поросят после отъема (в 30 – 37 дней) с первыми признаками диареи по принципу аналогов разделили на две группы – опытную и контрольную,

по 10 голов в каждой. Молодняку опытной группы (всему гнезду) скармливали препарат Афлуксид с болтушкой из комбикорма СК-3 и теплой кипяченой воды, согласно инструкции, в дозе 10 г порошка на одного поросенка за одно скармливание, применяли добавку 2 раза в сутки в течение 3 – 4 дней. Болтушку с Афлуксидом накладывали в переносные кормушки и размещали в гнезде. Поросята контрольной группы получали аналогичное средство – Диастоп. Согласно инструкции, перед применением содержимое пакетов № 1 и 2 растворяли в 1 литре теплой питьевой воды 37 °С. Лечебный раствор готовили непосредственно перед использованием и вводили индивидуально орально в дозе 10 мл/кг массы тела 2 раза в сутки в течение 3 дней.

Кровь для анализа брали из краниальной поллой вены, каждую пробу делили на 2 части, одну из которых стабилизировали гепарином. Гематологические и биохимические показатели крови и сыворотки определяли на приборе Mindray BC-2800Vet и программируемом биохимическом анализаторе БиАн-Е 9343. Единицы измерений определяли по ГОСТ «Единицы физической величины» (в соответствии с Международной системой СИ).

За животными наблюдали, учитывали тяжесть течения болезни, ее продолжительность и сохранность. Эффективность препаратов оценивали по выраженности признаков диареи – наличию темноокрашенных водянистых фекалий, повышенной температуре тела, апетиту, снижению массы тела.

Полученные данные обработали биометрически в Microsoft Excel.

Результаты исследований и обсуждение. У всех поросят опытной группы симптомы диареи ослабевали в течение 2,3±0,5 суток, на 3-й день полностью исчезали, возвращался аппетит, в норму приходил процесс дефекации (табл. 1). Если добавку начинали использовать вовремя, то

Таблица 1

Эффективность Афлуксида при желудочно-кишечных болезнях поросят

| Показатель | Группа | |
|---|---------------------------|----------------------------|
| | контрольная | опытная |
| | Тяжесть течения болезни | |
| | средняя | легкая |
| Количество поросят в начале опыта, гол. | 10 | 10 |
| Количество поросят в конце опыта, гол. | 8 | 10 |
| Доза, г | 10 мл/кг два раза в сутки | 10 г/гол. два раза в сутки |
| Сохранность, % | 80,0 | 100 |
| Срок лечения, суток | 4,9±0,6* | 2,3±0,5* |
| Падеж, гол. | 2 | – |

* $p < 0,05$.

болезнь протекала в легкой форме, в отличие от животных контрольной группы. Так как выздоровление наступало достаточно быстро, поросята не успевали терять массу тела из-за обезвоживания организма, как это происходило при средней и тяжелой форме диареи. Афлуксид, вероятно, способствовал улучшению состояния здоровья в самый критический период жизни, когда происходило формирование активного иммунитета. По-видимому, кормовая добавка, проходя через весь пищеварительный тракт, покрывала все поврежденные ворсинки тонкой кишки мельчайшими частицами монтмориллонита, адсорбировала бактерии, вирусы и токсины, препятствовала их всасыванию и выводила из организма [4, 5]. У животных опытной группы не зафик-

сировали ни одного случая падежа, побочных реакций, проявления гиперчувствительности.

Афлуксид не только обладает сорбционной способностью, но и стимулирует более быстрое восстановление всех жизненно важных функций, сокращает время проявления клинических симптомов диареи, стабилизирует защитный барьер слизистой желудочно-кишечного тракта [2, 4].

В контрольной группе при 80%-ной сохранности молодняка выздоровление наступило через 4,9±0,6 суток и прошло оно без осложнений.

В связи с тем что после отъема при смене рациона в организме молодняка происходят изменения биохимических и физиологических процессов, провели морфологические исследования крови (табл. 2).

Таблица 2

Влияние Афлуксида на гематологические и биохимические показатели крови поросят

| Показатель | Контрольная группа | | Опытная группа | | Норма |
|----------------------------------|--------------------|---------------|----------------|---------------|-------------|
| | до лечения | после лечения | до лечения | после лечения | |
| Лейкоциты, 10^9 кл/л | 7,5 ± 1,04 | 8,9 ± 1,20 | 7,9 ± 0,80* | 8,8 ± 0,75* | 8 – 16 |
| Эритроциты, 10^{12} г/л | 5,2 ± 0,44* | 6,1 ± 0,18* | 4,8 ± 0,90 | 7,1 ± 0,44 | 6 – 7,5 |
| Гемоглобин, г/л | 85 ± 5,11 | 98,5 ± 4,44 | 88,4 ± 14,10** | 115 ± 6,10** | 90 – 110 |
| Гематокрит, $\times 10^{-2}$ L/L | 26,3 ± 0,34 | 29,2 ± 0,05 | 27,2 ± 0,41 | 27,7 ± 0,72 | 26 – 35 |
| Кальций, ммоль/л | 2,23 | 2,50 | 2,18 | 2,60 | 2,50 – 3,50 |
| Фосфор неорг., ммоль/л | 1,50 ± 0,10 | 1,37 ± 0,16 | 1,6 ± 0,10 | 1,71 ± 0,16 | 1,30 – 1,90 |
| Глюкоза, ммоль/л | 1,31 | 2,7 ± 0,17 | 1,4 ± 0,10 | 2,7 ± 0,18 | 2,5 – 5,0 |
| Общий белок, г/л | 58,60 | 62,10 ± 3,21 | 60,50 ± 4,51** | 65,50 ± 3,24 | 65 – 85 |
| Холестерин, ммоль/л | 3,20 | 3,41 | 3,41 | 3,60 | 2,5 – 40 |

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Установили, что в начале опыта содержание лейкоцитов и эритроцитов в крови поросят контрольной и опытной групп было ниже референсных значений. После лечения эти показатели приходили в норму.

Концентрация гемоглобина в начале опыта также была ниже нормальной, у контрольных и опытных животных она составила соответственно 85,0 и 88,4 г/л (референсные величины – 90 – 110 г/л). После выздоровления поросят эти показатели достигали нормативных значений (98,5 и 115,0 г/л). Подобные изменения характерны для недостатка железа и являются следствием активации окислительно-восстановительных процессов в организме [1, 4].

Содержание общего кальция в сыворотке крови поросят экспериментальных групп оказалось практически одинаковым – 1,80 – 1,82 ммоль/л (на 10,8 – 12,8 % меньше нормы), а уровень фосфора также не различался между группами (1,5 – 1,6 ммоль/л), но оставался в пределах рекомендованных величин (1,3 – 1,9 ммоль/л). В конце эксперимента у молодняка регистрировали увеличение количества кальция до нормативных значений, существенных различий между группами не наблюдали.

Уровень глюкозы в сыворотке поросят контрольной и опытной группы был почти в 2 раза меньше референсных значений, так же как и содержание общего белка – соответственно на 9,5 % и на 7,0 % ниже. Концентрация холестерина при этом у всех животных оставалась в пределах нормы. Так как холестерин обнаруживают во всех тканях и жидкостях, его уровень в крови может не отражать общего содержания в организме [6].

Благодаря монтмориллониту добавка проявляет мощное адсорбирующее действие в отношении микотоксинов, хлориды натрия и кальция нормализуют водно-солевой баланс, глюкоза является доступным источником энергии [4].

При недостатке минеральных веществ нарушается и нормальное те-

чение физиологических процессов, что ведет к задержке роста и развития молодняка, снижению продуктивности, возникновению различного рода заболеваний [4]. Добавка способствовала быстрому восстановлению всех жизненно важных функций и общего состояния здоровья животных. В процессе применения препарата не было отмечено случаев непереносимости или побочных эффектов.

Результаты проведенных исследований показали, что Афлуксид – эффективное средство сорбционной терапии, оказывает выраженное антидиарейное действие и играет важную роль в нормализации процессов обмена веществ.

Заключение. Кормовая добавка Афлуксид сокращает период проявления основных клинических симптомов диареи у поросят, повышает сохранность, улучшает морфологический состав крови и укорачивает сроки лечения. Простота в применении, экономическая доступность, быстрый терапевтический эффект позволяют рекомендовать ее для лечения поросят с признаками диареи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гумеров В.Г. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. Справочник. СПб: Изд-во «ЛЕМА», 2013; 116.
2. Кунгурцева О.В., Глотова Т.И., Глов А.Г. Влияние антигенной вариабельности вируса вирусной диареи – болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота на результаты серологической диагностики. Ветеринарная патология. 2010; 1:20 – 24.
3. Лахов С.Д., Петрова Ю.В., Бачинская В.М. Опыт применения многокомпонентной кормовой добавки на основе бентонитовой глины в животноводстве. Иппология и ветеринария. 2022; 1:82 – 88.
4. Назарова А.А. Влияние нанопорошков железа, кобальта и меди на физиологическое состояние молодняка крупного рогатого скота: Автореф. дис. ... канд. биол. науки. Рязань, 2009; 17 с.
5. Раицкая В.И. Лечебные свойства препарата Афлуксид при желудочно-кишечных болезнях телят. Ветеринария. 2023; 5:46 – 49.
6. Щербаков А.В. Этиологическая структура инфекционных болезней свиней в животноводческих хозяйствах России. Актуальные проблемы инфекционной патологии животных: Матер. Межд. науч. конф. Владимир: ИПП «Велес», 2003; 146 – 150.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ДНК НА ФОНЕ ПОЛИМОРФИЗМА ВОЗБУДИТЕЛЯ ПРИ ЛЕЙКОЗЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Наталья Геннадиевна Козырева, к.б.н., ведущий научный сотрудник,
ORCID ID 0000-0003-4318-8173, nk07-73@mail.ru

ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН» (г. Москва, Россия)

В статье описаны результаты определения количественных характеристик генетических маркеров лейкозной инфекции у коров. Проведена оценка провирусной нагрузки (ПН) для полевых изолятов ДНК ВЛКРС с различным генетическим статусом. Для измеренных количеств ДНК установлены диапазон значений: $1,27 \times 10^1 - 2,85 \times 10^6$ ГЭ/мл и распределение по генотипам согласно средним значениям ПН (ГЭ/мл): IVG ($3,27 \times 10^1$) > VIIIG ($7,51 \times 10^6$) > IIG ($2,57 \times 10^5$) > IG ($5,38 \times 10^4$). Полученные данные составляют основу формирования панели контрольных образцов генетических профилей ВЛКРС для проведения дальнейших испытаний по совершенствованию профилактических мероприятий в рамках контроля лейкозной инфекции. **Ключевые слова:** вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), лейкозная инфекция, провирусная нагрузка (ПН), изолят ВЛ, генетический вариант ВЛ, ПЦР-РВ.

Relative quantitative characteristics of field isolates of BLV with different genetic status in bovine leukemia

N.G. Kozyreva, PhD in Biology, Leading researcher,
ORCID ID 0000-0002-7173-5501, nk07-73@mail.ru

All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine
named after K.I. Skryabin and Ya.R. Kovalenko of the RAS (Moscow, Russia)

The article describes the results of the study on determination of quantitative characteristics of genetic markers of leukemia infection in cows. The proviral load (PL) was estimated for field isolates of BLV DNA with different genetic status. The range of values for the measured DNA amounts was determined: $1,27 \times 10^1 - 2,85 \times 10^6$ GE/ml and the distribution by genotypes was found according to the average PL values (GE/ml): IVG ($3,27 \times 10^1$) > VIIIG ($7,51 \times 10^6$) > IIG ($2,57 \times 10^5$) > IG ($5,38 \times 10^4$). The obtained data will be used as a basis for the formation of a panel of control samples of BLV genetic profiles for further testing to improve preventive measures in the framework of leukemia infection control. **Key words:** bovine leukemia virus (BLV), leukemia infection, proviral load (PL), BLV isolate, BLV genetic variant, quantitative RT-PCR.

DOI:10.30896/0042-4846.2025.28.6.14-18

Энзоотический лейкоз (ЭЛ) крупного рогатого скота, как наиболее важное неопластическое заболевание в структуре инфекционных патологий животных, по официальной отчетности Россельхознадзора [1] прочно занимает лидирующие позиции и составляет около 60 %. На протяжении последних десятилетий эпидемический порог по неблагополучию остается повышенным, сохраняется многолетняя тенденция по выявлению неблагополучных пунктов (НП) с негативной динамикой с 2021 г. по III квартал 2023 г. Согласно действующим на территории РФ Ветеринарным правилам по лейкозу КРС от 24.03.2021 г. [2], регистрация неблагополучных пунктов

происходит при выявлении РИД-положительных животных, в результате чего с IV квартала 2021 г. произошел скачок числа НП приблизительно на порядок с $2,6 \times 10^2$ до $4,4 \times 10^3$ и заболеваемости – с позитивной динамикой (рис. 1).

Патоген наносит значительный экономический ущерб в животноводческой отрасли, особенно на молочных фермах. Возбудитель болезни – вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС, *bovine leukemia virus*, BLV) – дельтаретровирус (*Deltaretrovirus*) семейства РНК-содержащих ретровирусов (*Retroviridae*). Близкородственные представители данного рода Т-лимфотропный вирус типа 1 (ТЛВЧ-1, *HTLV-1*) у человека и ВЛКРС

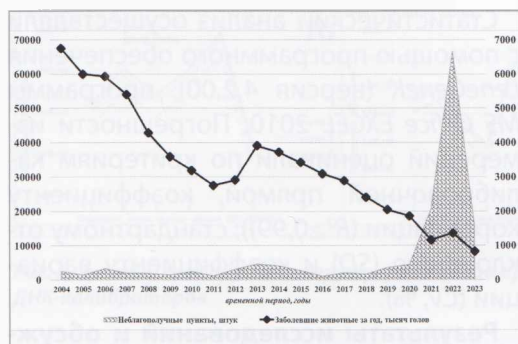


Рис. 1. Эпизоотическая ситуация по лейкозу крупного рогатого скота в РФ

вызывают персистирующую/латентную инфекцию, которая обычно остается бессимптомной, может приводить к развитию лейкемии или лимфомы. Жизненные циклы данных РНК-вирусов заключаются в заражении новых лимфоцитов (инфекционный цикл) или клональной экспансии инфицированных клеток (митотический цикл). Приоритетность этих двух фаз жизненного цикла/стратегии поведения вируса меняется во время течения инфекции. Большинство инфицированных клонов создаются на ранней стадии, до начала эффективного иммунного ответа. Позже основным путем репликации является митотическая экспансия уже существующих инфицированных клонов [6, 10].

Прямое обнаружение вируса и ранняя диагностика болезни в рамках изучения распространения лейкоза КРС и разработки профилактических мероприятий с использованием генетических маркеров инфекции и применением высокотехнологичных инструментов детекции инфекционного агента на основе современных амплификационных платформ (группа методов амплификации нуклеиновых кислот – МАНК) имеют большое значение для снижения биологических рисков.

Молекулярные техники (полимеразная цепная реакция – ПЦР), выявляющие интегрированный провирусный ге-

ном ВЛ в геноме хозяина, используют в дополнении к серологическим методам диагностики инфекции согласно Правилам [2]. В зависимости от целей и задач исследователя применяют различные варианты ПЦР, каждый из них полезный и чувствительный способ. Так, технология ПЦР напрямую определяет наличие провирусной ДНК у инфицированного животного с низкими, временными или отсутствующими титрами антител. После проведения ПЦР секвенирование и филогенетический анализ изолятов ДНК позволяют изучать генетический полиморфизм возбудителя. Сегодня в мире зафиксировано не менее 10 генотипов (G) ВЛКРС [5, 13]. Количественная ПЦР, основанная на амплификации общих консервативных *pol*-локусов генома данного ретровируса, представляет собой еще один высокоспецифичный и чувствительный инструмент обнаружения, в том числе, различных типов штаммов ВЛКРС при широком спектре географического происхождения. Этот метод также позволяет измерять провирусную нагрузку ДНК ВЛКРС как известных, так и новых вариантов патогена с изучением корреляции между количеством ВЛ и прогрессированием заболевания [4, 12] в зависимости от стадийности инфекционного процесса [8].

Известно, что вирусная инфекция вызывает поликлональное распространение большой разнородной популяции лимфоцитов, содержащих, как минимум, от одного до трех интегрированных провирусов [9]. Уровень провирусной нагрузки (ПН), соответствующая порядку 10^4 копиям в крови животного, свидетельствует об эффективном распространении ВЛ в организме хозяина, являясь относительно высоким числом в качестве порога, позволяющего различать высокие и низкие значения провирусной нагрузки у коров [11]; при патогенезе ПН

носит колебательный характер, не являясь стабильной [7].

В рамках совершенствования генодиагностики лейкозной инфекции на основе амплификационных технологий на данном этапе проводится работа по созданию панели контрольных образцов генетического профиля изолятов ВЛКРС. Цель исследования – определение индивидуального уровня провирусной нагрузки у крупного рогатого скота и распределения количественного показателя среди генетических вариантов изолятов ВЛКРС.

Материалы и методы. В данной работе анализировали полевой материал, полученный от коров (Гем', РИД'), – изоляты провирусной ДНК ВЛКРС ($n=22$) с известным генетическим статусом по *pol/env* генам, в частности, I/II/VII генотипов (G) на основе *env* локуса [5]. Образцы провирусной ДНК хранили в холодильной камере при температуре не выше минус 18 °C без многократного размораживания/замораживания.

Амплификацию ДНК фрагментов провирусных генов ВЛКРС (*pol/ tax*) проводили в качественном мультиплексном варианте ПЦР-РВ согласно Наставлениям [3] с использованием внутреннего контроля анализа (*BoLA-DRA* участок генома KРС).

Количество ДНК ВЛКРС определяли с помощью плазмидного препарата – *pBLVpol_VIEV* на платформе ПЦР-РВ в мультиплексном варианте [4] с диапазонами измерения трех серий системы ДНК-калибраторов: (1,0) (1,12) (1,25) $\times 10^1$ – 10^8 ГЭ/мл.

Статистический анализ осуществляли с помощью программного обеспечения *GeneK* (версия 4.2.00), программы *MS Office EXCEL 2010*. Погрешности измерений оценивали по критериям калибровочной прямой, коэффициенту корреляции ($R^2 \geq 0,99$); стандартному отклонению (*SD*) и коэффициенту вариации (*Cv*, %).

Результаты исследований и обсуждение. В процессе анализа сходимости и воспроизводимости измерений выявили степень разброса полученных данных амплификации ДНК-калибраторов по значениям пороговых циклов (*Ct*) и концентрации ДНК ВЛКРС (*conc*), которые составили: $SD_c = 0,14$, $Cv_c = 0,019$ %; $SD_{conc} = 0,05$, $Cv_{conc} = 0,032$ % и обнаружили их соответствие диапазонам оптимизированных критериев стандартизации и отладки данной технологии: $SD_{Ct} \leq 0,5$, $Cv_{Ct} \leq 0,02$ %; $SD_{conc} \leq 0,1$; $Cv_{conc} \leq 0,05$ %.

Рассчитанные уровни провирусной нагрузки в образцах ДНК с известным генетическим профилем находились в диапазоне: $1,27 \times 10^1$ – $2,85 \times 10^6$ ГЭ/мл (табл. 1).

Во время проведения экспериментов образцы ДНК подвергали, как минимум, трем циклам размораживания/замораживания, что существенно не повлияло на уровень провирусной нагрузки. В дальнейшем планируется определить предельное число данных циклов, которое не приведет к изменению количественных показателей при включении выбранных кандидатов в состав панели контрольных образцов.

Таблица 1

Количественная оценка провирусной ДНК в полевых образцах изолятов ВЛКРС с различным генетическим статусом (G)

| Генетический вариант ВЛКРС, G | Значения провирусной нагрузки | | | SD | CV, % |
|-------------------------------|---|--------------------|-----------|------|-------|
| | граничные, ГЭ/мл | средние, ГЭ/мл | <i>Ig</i> | | |
| IG ($n=6$) | $4,91 \times 10^2$ – $3,09 \times 10^5$ | $5,99 \times 10^4$ | 4,16 | 0,06 | 0,02 |
| IIIG ($n=10$) | $1,27 \times 10^1$ – $2,85 \times 10^6$ | $2,75 \times 10^5$ | 3,84 | 0,07 | 0,02 |
| VIIIG ($n=6$) | $1,32 \times 10^1$ – $1,16 \times 10^6$ | $4,35 \times 10^5$ | 4,24 | 0,06 | 0,03 |

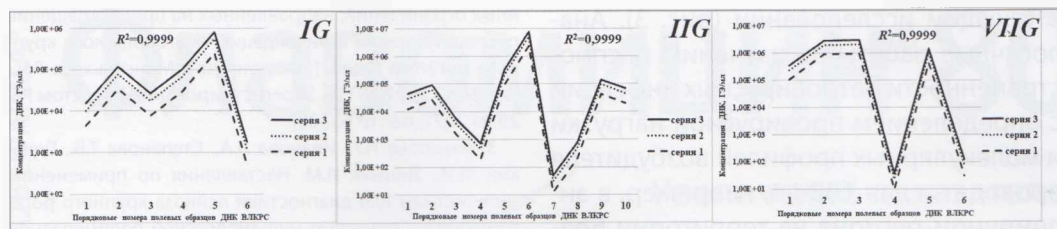


Рис. 2. Уровень провирусной нагрузки у изолятов с разными генотипами ВЛКРС в зависимости от серии ДНК-калибраторов

Таблица 2

Сводные результаты измерения провирусной нагрузки у животных с различными генетическими вариантами ВЛКРС

| Генетический вариант ВЛКРС | Значения провирусной нагрузки, ГЭ/мл | | |
|----------------------------|--------------------------------------|--------------------|--------------------|
| | среднее | минимум | максимум |
| IG | $5,99 \times 10^4$ | $4,91 \times 10^2$ | $3,09 \times 10^5$ |
| IIG | $2,75 \times 10^5$ | $1,27 \times 10^2$ | $2,85 \times 10^6$ |
| IVG | $3,27 \times 10^7$ | $2,02 \times 10^4$ | $2,76 \times 10^8$ |
| VIIG | $7,51 \times 10^6$ | $1,23 \times 10^2$ | $7,16 \times 10^7$ |

Корреляцию расчетных значений концентраций между сериями (1, 2, 3) ДНК-калибраторов подтвердили коэффициентом корреляции – $R^2=0,9999$ (рис. 2).

Максимальные ($Conc_{cp}=4,35 \times 10^5$ ГЭ/мл) количества ДНК обнаружили у изолятов с VIIG, минимальные ($Conc_{cp}=5,99 \times 10^4$ ГЭ/мл) – у изолятов с IG, между ними – у изолятов IIG ($Conc_{cp}=2,75 \times 10^5$ ГЭ/мл) с соответствующим распределением уровней провирусной нагрузки: VIIG>IIG>IG.

Согласно сводной информации с учетом результатов предыдущих измерений провирусной нагрузки [5] у животных, от которых ранее выделяли изоляты ДНК ВЛКРС IVG и VIIG генотипов, тенденция распределения провирусной нагрузки повторилась: IVG>VIIG>IIG>IG. Так, самое высокое количество патогена обнаружили у изолятов ВЛКРС с IVG ($Conc_{cp}=3,27 \times 10^7$ ГЭ/мл), самое низкое ($Conc_{cp}=5,38 \times 10^4$ ГЭ/мл) с IG и промежуточные ($Conc_{cp}=2,75 \times 10^5$ ГЭ/мл) с IIG и ($Conc_{cp}=7,51 \times 10^6$ ГЭ/мл) VIIG генетическими вариантами (табл. 2).

Уровень провирусной нагрузки для животных с генотипами ВЛКРС IG и IVG

отличался в $5,5 \times 10^2$ раза, с IG и VIIG – в $1,25 \times 10^2$ раза, с IIG и IVG – в $1,2 \times 10^2$ раза, с IIG и VIIG – в 27 раз. Между собой варианты с высокими значениями провирусной нагрузки (IVG и VIIG) отличались в 4 раза, с низкими (IG и IIG) – в 5 раз (рис. 3).

Ранее при изучении нами полиморфизма елв-изолятов провирусной ДНК ВЛКРС, циркулирующих на территории некоторых регионов РФ, структура генетического разнообразия была распределена следующим образом: IVG(93 %)>VIIG(13 %)>IIG(6 %)>IG(4 %) [5], что сопоставимо ($R^2=0,9499$) с выявленным ранжированием уровней провирусной нагрузки по генотипам ВЛКРС

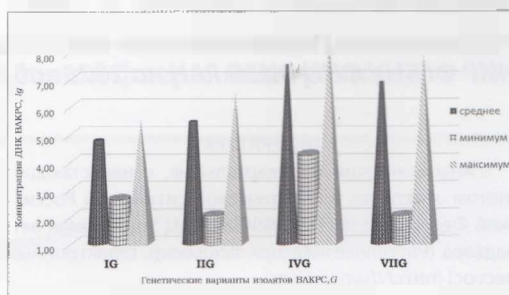


Рис. 3. Распределение провирусной нагрузки среди генотипов ВЛКРС

в текущем исследовании (рис. 3). Аналогичные работы по изучению распространенности ретровирусных инфекций с определением провирусной нагрузки и молекулярных профилей возбудителя проводят и для ТЛВЧ-1, например, в эндемичном регионе на территории Бразилии среди городского населения. По мнению авторов, связь между провирусной нагрузкой и клинической картиной является сложной и многофакторной, где одним из факторов могут выступать генетические мутации [14].

Заключение. Определен индивидуальный уровень провирусной нагрузки у коров и установлено распределение количества провирусной ДНК среди генетических вариантов изолятов ВЛКРС. Выявлена корреляция между количественным показателем (по *proI* локусу) и частотой обнаружения того или иного генотипа (по *env* локусу) патогена. Подобранные образцы ДНК и прошедшие валидацию с помощью данных генодиагностических инструментов будут включены в состав панели контрольных образцов (полевых проб ДНК ВЛКРС) с генетическим профилем ВЛКРС для проведения дальнейших испытаний количественной тест-системы с целью совершенствования профилактических мероприятий по контролю лейкозной инфекции.

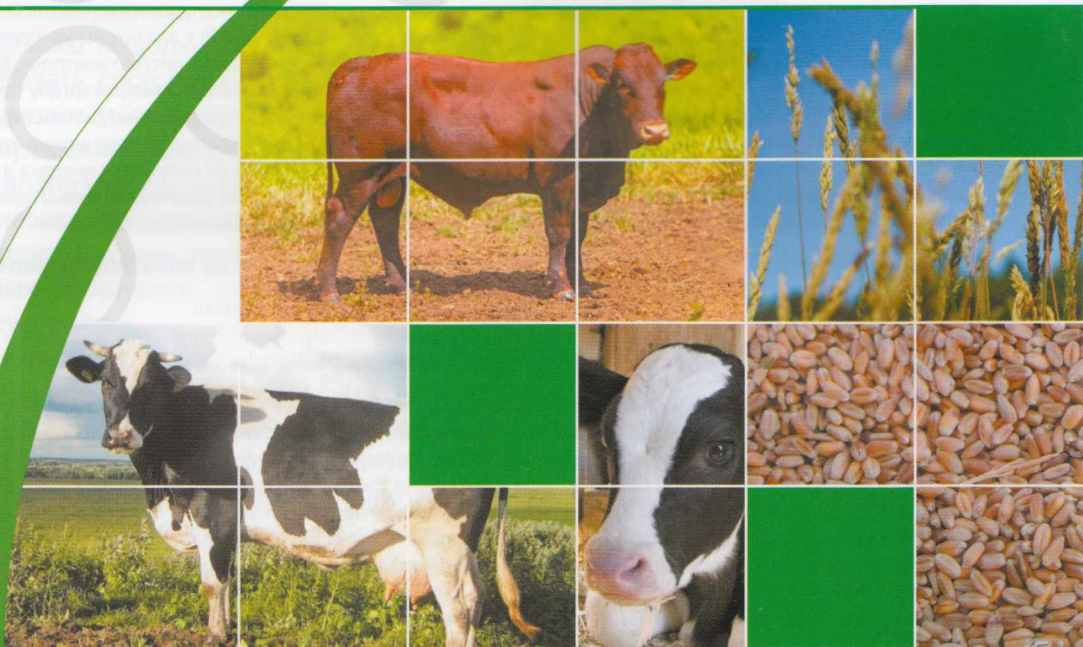
Данная работа выполнена в рамках государственного задания в соответствии с утвержденным планом НИР ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН на 2025 год.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аналитические ежеквартальные, с нарастающим итогом отчеты по эпизоотической ситуации в Российской Федерации (ФГБУ ВНИИЗЖ, ИАЦ Управления ветнадзора (Россельхознадзор). Владимир. [Электронный ресурс] (<http://fsvps.gov.ru>).
2. Ветеринарные правила осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов лейкоза крупного рогатого скота: [утв. приказом Минсельхоза России 24.03.2021, №156. Зарегистрировано Минюстом РФ 29.04.2021, пер. № 63300].
3. Козырева Н.Г., Иванова Л.А., Степанова Т.В., Гулюкин М.И., Донник И.М. Наставления по применению тест-системы для диагностики лейкоза крупного рогатого скота с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. М.: «Агентство творческих технологий», 2019; 38 с.
4. Козырева Н.Г., Комина А.К., Абашин И.Ю., Степанова Т.В. Алгоритм определения количества ДНК провируса лейкоза крупного рогатого скота на основе ПЦР с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Ветеринария. 2023; 9:23 – 28.
5. Козырева Н.Г., Степанова Т.В., Абашин И.Ю. Мониторинг лейкоза крупного рогатого скота на основе современных технологий геномного анализа с целью обеспечения биобезопасности молочной продукции. Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии». 2024; 4 (52):524 – 532. <https://doi.org/10.36871/vet.san.hyg.ecol.202404007>
6. Gillet N., Florins A., Boxus M. et al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: Prospects for novel anti-retroviral therapies in human. Retrovirology. 2007; 4:18. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-4-18>
7. Hutchinson H.C. Transmission and Progression of Bovine Leukemia Virus. Michigan State University. 2020.
8. Jimba M., Takeshima S.N., Matoba K. et al. BLV-CoCoMo-qPCR: Quantitation of bovine leukemia virus proviral load using the CoCoMo algorithm. Retrovirology. 2010; 7:91. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-7-91>
9. Kettmann R., Portetelle D., Mammerickx M. et al. Bovine leukemia virus: an exogenous RNA oncogenic virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1976; 73: 1014 – 1018. DOI:10.1073/pnas.73.4.1014
10. Lairmore M.D., Anupam R., Bowden N. et al. Molecular determinants of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and spread. Viruses. 2011; 3:1131 – 1165.
11. Lo C.W., Borjigin L., Saito S. et al. BoLADRB3 Polymorphism is Associated with Differential Susceptibility to Bovine Leukemia Virus-Induced Lymphoma and Proviral Load. Viruses. 2020; 12(3):352. <https://doi.org/10.3390/v12030352>
12. Takeshima S.N., Kitamura-Muramatsu Y., Yuan Y. et al. BLV-CoCoMo-qPCR-2: Improvements to the BLV-CoCoMo-qPCR assay for bovine leukemia virus by reducing primer degeneracy and constructing an optimal standard curve. Arch. Virol. 2015; 160:1325 – 1332.
13. Yu C., Wang X., Zhou Y. et al. Genotyping bovine leukemia virus in dairy cattle of Heilongjiang, northeastern China. BMC Vet. Res. 2019; 15(1):179. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1863-3>
14. Amianti C., Bandeira L.M., Cardoso W.M. et al. HTLV infection in urban population from Mato Grosso do Sul, Central Brazil. Retrovirology. 2024; 21:18. <https://doi.org/10.1186/s12977-024-00650-1>

Флавомицин® 80

Увеличение показателей
продуктивности у телят, дойных
коров, быков на откорме



Снижает уровень заболеваемости ЖКТ
и сокращает выделение патогенных бактерий



Повышает привесы у телят и быков
на откорме, а также показатели
продуктивности дойных коров



Сохраняет естественный защитный баланс
бактериальной флоры кишечника



ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕЧЕНИ КУРИНЫХ ЭМБРИОНОВ, ЗАРАЖЕННЫХ АДЕНОВИРУСОМ ПТИЦ

Елена Михайловна Гулюкина, аспирант, младший научный сотрудник, novichkova.em@mail.ru
ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрабина и Я.Р. Коваленко РАН»
(г. Москва, Россия)

Аденовирусная инфекция птиц широко распространена среди поголовья 3 – 5-недельного возраста. Одним из проявлений данной инфекции является инклюзионный гепатит. В статье описано экспериментальное заражение аденовирусом птиц SPF куриных эмбрионов (КЭ) в целях патогистологического исследования печени. Перед экспериментом эмбрионов разделили на две группы: первая – группа заражения – КЭ в аллантоисную полость ввели 0,2 мл вирусосодержащей суспензии в концентрации $2 \lg \text{EID}_{50}$; вторая – группа чистого контроля. Вскрытие осуществляли на третьи, шестые и девятые сутки после заражения, оценивали макро- и микрокартину печени. По итогам исследования сделали вывод о том, что вирусный гепатит птиц можно предварительно диагностировать по специфическим патогистологическим изменениям печени куриных эмбрионов, благодаря чему можно исключить или подтвердить инфицирование куриных эмбрионов инклюзионным гепатитом до получения выводка и принять своевременные меры для сохранения здоровья формирующегося поголовья птиц. **Ключевые слова:** аденовирусная инфекция птиц, экспериментальное заражение куриных эмбрионов, вирусный гепатит, гистология.

Histological examination of the liver of chicken embryos infected with avian adenovirus

E.M. Guliukina, Junior researcher, novichkova.em@mail.ru
All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine
named after K.I. Scriabin and Ya.R. Kovalenko RAS (Moscow, Russia)

Avian adenovirus infection is widespread among birds aged 3 – 5 weeks. One of the manifestations of this infection is inclusive hepatitis. The article describes experimental infection with avian adenovirus in SPF chicken embryos (CE) for the purpose of pathohistological examination of the liver. During the experiment, two embryos were divided into two groups – the control group and CE, which were injected into the allantois cavity with 0.2 ml of a virus-containing suspension at the concentration of $2 \lg \text{EID}_{50}$. The autopsy was performed on the third, sixth, and ninth days after infection, during it the pathoanatomic and histological changes in the liver were examined. Based on the results of our study, it was concluded that avian viral hepatitis can be pre-diagnosed by specific pathohistological changes in the liver of chicken embryos. Therefore, it is possible to exclude or confirm infection of chicken embryos with inclusive hepatitis before hatching and to take timely measures to preserve the health of the emerging bird population. **Key words:** avian adenovirus infection, experimental infection of chicken embryos, viral hepatitis, histology.

DOI:10.30896/0042-4846.2025.28.6.20-24

Многочисленные научные исследования доказывают, что в условиях современной интенсификации птицеводства благополучие птичьего стада крайне уязвимо перед разнообразием вирусных инфекций [3]. Специфическая профилактика наиболее распространенных из них способствует сохранению здоровья цыплят и взрослого поголовья, тем не менее, существуют опасные инфекции, при которых вакцинация птицы затруднена в связи с многообразием серотипов патогена [1]. К ним относится вирусный инклюзионный гепатит, возбудителем которого является вирус семейства *Adenoviridae*, рода *Aviadenovirus*, группы *CELO*, объединяющей несколько совокупностей серотипов [4].

Серотипы FAdV-1 – FAdV-12 вызывают у кур патологии различных внутренних органов, а FAdV-4, FAdV-1, FAdV-8a и FAdV-8b – дополнительно могут обуславливать гепатит [9]. К данному заболеванию наиболее чувствительны цыплята-бройлеры в возрасте от 3 до 5 недель, течение инфекции, как правило, латентное. Для аденовирусного гепатита характерно широкое распространение в связи с длительно бессимптомным течением, а также со способностью возбудителя передаваться не только горизонтальным, но и трансвариальным путем [1, 3, 4]. При этом возможен и внезапный падеж до 80 % поголовья, приводящий к трудно восполняемым экономическим потерям [3].

Существует множество научных публикаций, в которых описаны патоморфологические и гистологические изменения печени при инклюзионном гепатите птицы разного возраста. Однако таких же данных о структуре ткани печени куриных эмбрионов мало [1, 4, 9]. Поэтому возможность оценить патогистологическую картину печени куриных эмбрионов, входящих в группу ожидаемого выводка, позволяет спрогнозировать состояние здоровья будущих цыплят и при необходимости заблаговременно разработать стратегию противоэпизоотических мероприятий. Цель наших исследований – изучить патогистологические изменения печени куриных эмбрионов, зараженных аденовирусом птиц.

Материалы и методы. Для выполнения эксперимента сформировали две группы десятидневных SPF куриных эмбрионов (КЭ): первая – в аллантаисную полость КЭ инокулировали аденовирус серотипа FAdV-4, инъецируя им вирус-содержащую суспензию, состоящую из гомогената печени больного цыпленка в концентрации $2 \lg \text{ЭИД}_{50}$ и 0,9%-ного раствора натрия хлорида в дозе 0,2 мл; вторая группа КЭ – чистый контроль, им в аллантаисную полость вводили стерильный 0,9%-ный раствор хлорида натрия в соответствующей дозе. На 3-, 6- и 9-е сутки выполняли контрольное вскрытие. Отобранный материал фиксировали в 10%-ном растворе формалина, после проводки его заливали в парафиновые блоки. С помощью роторного проточного микротомы Microm HM325 (Thermo Scientific, Германия) готовили гистологические срезы толщиной 4 мкм и окрашивали их гематоксилином и эозином по стандартной методике.

Результаты исследований. При вскрытии куриных эмбрионов обеих групп через трое суток после зараже-

ния патологических изменений макрокартины печени не выявили. По данным гистологического исследования установили, что в образцах печени КЭ первой группы гистоархитектоника большей части паренхимы органа была схожа с таковой КЭ второй группы, однако, стоит отметить, что наблюдали единичные гепатоциты с уменьшенным в размере и неправильной формы ядром, характерные для кариопикноза. У КЭ второй группы границы долек паренхимы печени трудно визуализировались, паренхима органа была обильно и диффузно инфильтрирована эритроцитами, в просвете синусоидных капилляров регистрировали единичные гранулоциты. Подобное полнокровие паренхимы, согласно другим исследованиям, соответствует норме возраста куриного эмбриона 13 суток [6]. Таким образом, гепатоциты инфицированных КЭ претерпевали патологические изменения уже в первые дни заражения, а отсутствие иммунной реакции можно объяснить неполным развитием системы иммунитета к 13-дневному возрасту.

Макроскопическое исследование печени на 6-е сутки после заражения показало у КЭ первой группы изменение цвета органа на желто-бурый, а у КЭ второй цвет органа оставался в пределах нормы – красно-бурый.

При гистологическом исследовании печени КЭ первой группы выявили многочисленные крупные вакуоли в цитоплазме гепатоцитов, ярко выраженное расширение синусоидных капилляров и крупные очаги экстрамедуллярного гемопоэза. Кроме этого, наблюдали небольшие очаги некроза гепатоцитов, а также группы мелких насыщенно оксифильных включений, свободно лежащих в паренхиме органа. И напротив, гистологическая картина печени КЭ второй группы характеризовалась компактным

и равномерным расположением гепатоцитов, их ядра были округлой формы, цитоплазма однородная. В просвете синусоидных капилляров регистрировали эритроциты. В паренхиме органа располагались местами небольшие очаги экстрамедуллярного гемопоэза. Вероятно, в гепатоцитах печени зараженного организма происходят метаболические нарушения, а выраженное расширение синусоидных капилляров может свидетельствовать о развитии отека паренхимы органа (рис. 1).

При патологоанатомическом вскрытии КЭ первой группы на 9-е сутки после инфицирования установили, что печень от всех экспериментальных эмбрионов была значительно увеличена в

размере, с округлыми краями, желтого или темно-бурого цвета. В ходе гистологического анализа выявили обширную инфильтрацию периваскулярного пространства большинства кровеносных сосудов гранулоцитами и клетками лимфоидного ряда, выраженное расширение синусоидных капилляров и смазанность границ гепатоцитов (рис. 2). При вскрытии КЭ второй группы на данную контрольную точку эксперимента патологических изменений на макро- и микроуровне не наблюдали.

Выявленную патологию в печени эмбрионов первой группы можно связать с развитием патологического процесса в ткани на фоне экспериментального заражения вследствие ответной реак-

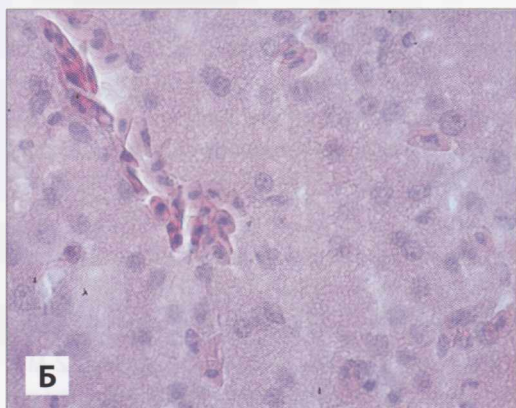
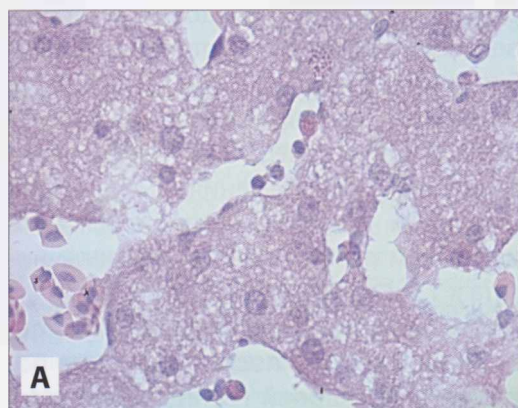


Рис. 1. Микрокартина паренхимы печени куриных эмбрионов на 6-е сутки: А – первая группа; Б – вторая группа (гематоксилин и эозин, х630)

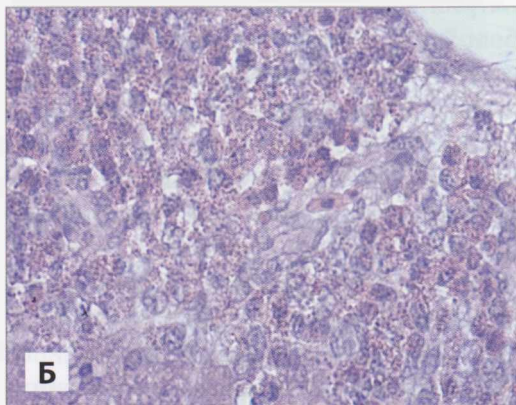
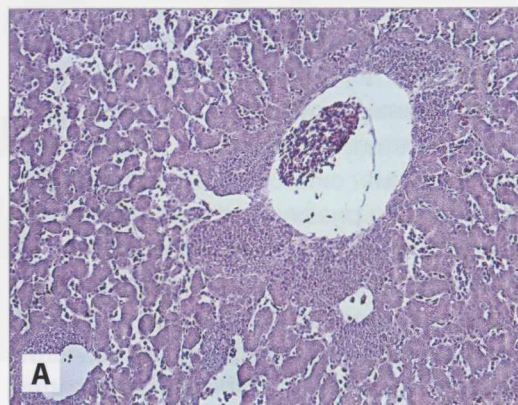


Рис. 2. Печень КЭ второй группы, 9-е сутки после заражения: А – общий вид паренхимы (х200); Б – инфильтрация гранулоцитами периваскулярного пространства (х630) (гематоксилин и эозин)

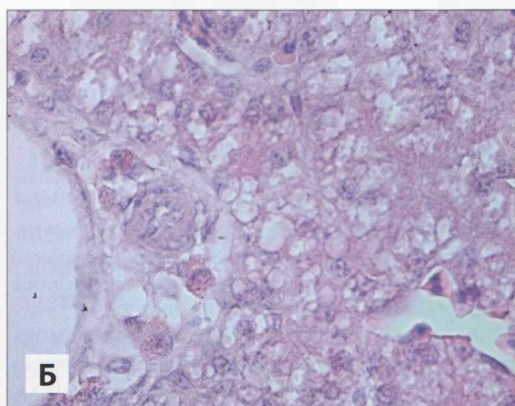
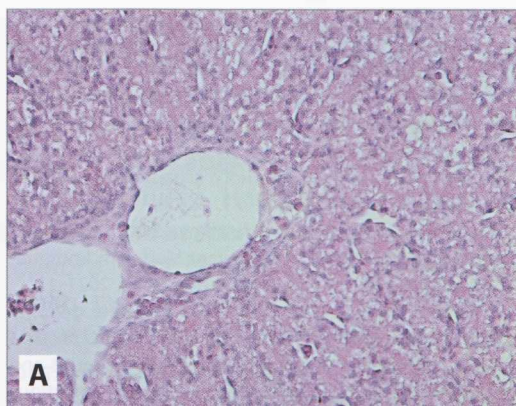


Рис. 3. Триада печени КЭ на 9-е сутки после заражения аденовирусом птиц – А (х200) и Б (х630) (гематоксилин и эозин)

ции иммунитета, так, по данным ученых, к возрасту 19 суток лейкоциты куриных эмбрионов уже способны выполнять свои функции, что обуславливает клеточный ответ в органе [8].

В области печеночного тракта наряду со скоплением гранулоцитов наблюдали массивную крупнокапельную вакуолизацию цитоплазмы гепатоцитов и очаги их некроза различных размеров, а также нарушение гистоархитектоники стенки желчевыводящего протока в виде набухания и лизиса его структур (рис. 3). Описываемую клеточную патологию в перипортальной области можно охарактеризовать как развитие гидропической дистрофии на фоне паренхиматозной интоксикации у зараженных эмбрионов.

При изучении печени куриных эмбрионов, экспериментально зараженных аденовирусом птиц (FAdV-4), установили, что патологические изменения гепатоцитов можно наблюдать начиная с первых дней инфицирования. Нарушение метаболического процесса в клетках органа приводит к развитию гидропической дистрофии клеток паренхимы, нарастающему отеку паренхимы с последующим некрозом гепатоцитов на фоне диссеминации вируса в организме. Иммунный клеточный ответ

можно наблюдать только после наступления периода формирования иммунокомпетентных органов у куриных эмбрионов (после 13-дневного возраста), что характеризуется развитием обширных очагов экстрамедуллярного гемопоэза у инфицированных КЭ, а к сроку окончательного развития иммунитета в ткани печени появляется возможность регистрировать клеточную иммунную реакцию в ответ на возбудителя инфекции – периваскулярную инфильтрацию клетками лейкоцитарного ряда (гранулоцитами и лимфоцитами) печеночных трактов.

Заключение. Результаты гистологического исследования печени куриных эмбрионов, зараженных аденовирусом птиц, показали, что вирусный гепатит можно предварительно диагностировать по специфическим патогистологическим изменениям в органе, т.е. до получения выводка исключить или подтвердить инфицирование их инклюзионным гепатитом и соответственно принять своевременные меры для сохранения здоровья формирующегося поголовья птиц.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисов В.В. Специфическая профилактика синдрома гидроперикардита кур. Матер. конф. по птицеводству. Зеленоград, 2003; 206, 207.

2. Ельников Е.В., Борисов В.В. Изучение патогенных свойств полевых изолятов аденовирусов кур, выделенных на территории Российской Федерации. Ветеринарная патология. 2006; (4):126 – 131.

3. Зеленский Ю.Р., Волков М.С. и др. Аденовирусные инфекции птиц: многообразие возбудителей, опасность для птицеводства и проблемы иммунопрофилактики (обзор). Ветеринария сегодня. 2024; 13(1):36 – 43.

4. Коровин В.И. Патогенез, диагностика аденовирусного гидроперикардита кур и его ассоциированного течения с другими инфекционными болезнями птиц: Автореф. дис. ... канд. вет. наук. СПб., 2005; 3 с.

5. Корчемкин В.Н., Сулейманов Ф.И. Изменение органов иммунной системы и морфологического состава крови кур в онтогенезе. Известия Великолукской ГСХА. 2021; 1:18 – 28.

6. Тимченко Л.Д., Трунова А.П. Особенности гистологического строения печени куриных эмбрионов на разных стадиях развития. Сборник науч. работ «Естествознание и гуманизм». Томск, 2007; 4(2):38.

7. Шашанов И.Р., Тельцов Л.П., Николаев А.Д. и др. Эмбриогенез. Периодизация развития кур. Известия Оренбургского государственного аграрного университета. Саранск, 2008; 4(20):64 – 71.

8. Garcia P, Wang Y, Viallet J, Jilkova Z.M. The Chicken Embryo Model: A Novel and Relevant Model for Immune-Based Studies. *Sec. Comparative Immunology*. 2021; 12.

9. Xie Z., Zhang J., Sun M. The first complete genome sequence and pathogenicity characterization of fowl adenovirus serotype 2 with inclusion body hepatitis and hydropericardium in China. *Sec. Veterinary Infectious Diseases*. 2022; 9.

УДК 619:616.98:578.822.2:616-076:578.23

КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА «ЭС-95» ПАРВОВИРУСА СОБАК

Михаил Евгеньевич Власов, к.в.н., начальник группы, VlasovMikhail1993@yandex.ru

Анна Александровна Чадаева, к.б.н., младший научный сотрудник, a_doct_or@mail.ru

Ирина Петровна Синдрякова, к.б.н., заведующая сектором, sindryakova.irina@yandex.ru

Ольга Львовна Колбасова, к.б.н., доцент, заведующая сектором, olgakolbasova@gmail.com

Ольга Сергеевна Поволяева, к.б.н., заместитель руководителя группы, 2741188@mail.ru

Сергей Григорьевич Юрков, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник, patronn13@rambler.ru
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», info@ficvim.ru

Парвовирусный энтерит – одна из наиболее контагиозных и тяжелых болезней собак. Многообразие циркулирующих изолятов парвовируса свидетельствует о значительной генетической вариабельности патогена. Филогенетический анализ, рассматриваемый как инструмент молекулярной эпизоотологии, указывает на «горячие» точки в геноме, определяющие направление эволюции возбудителя. В работе представлены результаты исследований культуральных свойств штамма «ЭС-95» возбудителя парвовирусного энтерита собак, и показано, что наиболее перmissive для вируса является перевиваемая линия клеток селезенки кошки по оценке вирусрепродуцирующей активности клеток и данным реакции гемагглютинации. Филогенетический анализ позволил отнести изучаемый штамм к парвовирусу собак типа CPV-2, который формирует отдельный кластер совместно с изолятами возбудителей, выделенными от собак на «свободном выгуле» в Канаде, Уругвае и Италии. **Ключевые слова:** культуры клеток, вирусы, парвовирусный энтерит собак, молекулярно-генетическая характеристика, гемагглютинация, инфекционная активность.

Cultural properties and molecular genetic characteristics of the strain “ES-95” of canine parvovirus

M.E. Vlasov, PhD in Veterinary Science, Chief group, Vlasov Mikhail1993@yandex.ru

A.A. Chadaeva, PhD in Biology, Junior researcher, a_doct_or@mail.ru

I.P. Sindryakova, PhD in Biology, Head of the sector, sindryakova.irina@yandex.ru

O.L. Kolbasova, PhD in Biology, Assistant professor, Head of the sector, olgakolbasova@gmail.com

O.S. Povolayaeva, PhD in Biology, Deputy head of the group, 2741188@mail.ru

S.G. Yurkov, PhD in Biology, Professor, Chief researcher, patronn13@rambler.ru

Federal Research Center for Virology and Microbiology (Vladimir region, Volginskii, Russia)

Canine parvovirus enteritis – is one of the most contagious and severe disease of dogs. Diversity of isolates indicates a sufficient genetic variability of the virus. Phylogenetic analysis, considered as a tool of molecular epizootology, at the same time indicates “hot” spots in the genome that determine the direction of the pathogen evolution. In the presented work, the cultural properties of the canine parvovirus enteritis strain «ES-95» were studied. It was shown that the most permissive cell culture for the virus cultivation is a transplantable line of cat spleen cells, both according to the results of assessing the virus-reproduction activity of cells and results of a hemagglutination reaction. Phylogenetic analysis allowed us to classify the studied strain as canine parvovirus type CPV-2, which forms a separate cluster together with virus strains isolated from dogs on “free range” in Canada, Uruguay and Italy. **Key words:** cell cultures, viruses, canine parvovirus enteritis, molecular-genetic characterization, hemagglutination, infectious activity.

DOI:10.30896/0042-4846.2025.28.6.24-30

Парвовирусный энтерит собак – высококонтагиозная остропротекающая вирусная болезнь, характеризующаяся рвотой, геморрагическим гастроэнтеритом, миокардитом, лейкопенией и дегидратацией. Наиболее восприимчивы щенки в возрасте от двух месяцев до одного года [4]. Заболевание впервые было зарегистрировано в России (бывшем СССР) во время проведения XXII летних Олимпийских игр в 1980 г., в связи с этим оно получило неофициальное название «олимпийка» [5]. Клиническая картина парвовирусного энтерита собак может проявляться в трех формах: кишечной, сердечной (миокардитная) и смешанной, протекающих, как правило, молниеносно и остро. Обусловлены они способностью возбудителя размножаться в клетках с высокой митотической активностью – клетки эпителия кишечника, селезенки и миокарда [6, 16]. Сердечную (миокардитная) форму болезни чаще регистрируют у молодых щенков до 1,5 – 2-месячного возраста. В старшем возрасте наблюдают кишечную форму [1]. Чаще подвержены заражению породы: доберман, английский спрингер-спаниель, ротвейлер, американский питбультерьер, немецкая овчарка, американский стаффордширский терьер, лабрадор-ретривер [3, 14].

Выделяют два типа парвовируса, поражающего собак: парвовирус собак 2 (CPV-2) и парвовирус собак 1 (CPV-1) или мелкий вирус собак (MVC) [23]. Предполагают, что CPV-2 произошел от вируса панлейкопении кошек и претерпел генетические изменения, давшие начало трем его вариантам (CPV-2a, CPV-2b и CPV-2c). По своим свойствам парвовирус собак близок к вирусу энтерита норки, вирусу панлейкопении кошек, парвовирусу енота и голубой лисицы, которые были объединены в одну подгруппу, имеющую общего предка. CPV-2

имеет 98 % филогенетической гомологии с вирусом панлейкопении кошек. Несмотря на генетическое родство, данные патогены обладают специфическими биологическими характеристиками – видом восприимчивых хозяев, антигенными и гемагглютинирующими свойствами [7, 19, 22]. CPV-2 реплицируется *in vitro* в культурах клеток, полученных из тканей собак и кошек, а CPV-1 – только в культурах клеток из тканей собак. Для культивирования CPV-2 используют перевиваемые линии клеток почек кошки CRFK (Crandell-Rees Feline Kidney), линию клеток собак Walter Reed (WRCC), линию клеток почки собаки Madin Darby (MDCK) и линию клеток собак A-72 (опухоль собак) [13, 15]. Показано, что он может взаимодействовать и связываться с рецептором сиаловой кислоты и агглютинировать эритроциты. Гемагглютинирующая активность разных парвовирусов по отношению к эритроцитам различных видов животных неодинакова и зависит от pH. Реакцию гемагглютинации проводят с использованием эритроцитов свиньи, козы, макаки-резус и собаки [17, 18].

Цель исследований – изучение культуральных свойств и определение видовой принадлежности в соответствии с современной классификацией, а также филогенетический анализ штамма «ЭС-95», представленного в паспортных данных как парвовирус плотоядных.

Материалы и методы. В работе использовали перевиваемые культуры клеток: почки кошки – CRFK (каталожный № 34) и селезенки кошки – FS (каталожный № 55) из коллекции клеточных культур ФГБНУ ФИЦВиМ [9]; парвовирус штамм «ЭС-95», выделенный в 1995 г. от щенка с атипичной формой парвовирусного энтерита собак из «Государственной коллекции микроорганизмов, вызывающих опасные, особо опасные, в

том числе зооантропонозные и не встречающиеся на территории страны болезни животных» (реестровый номер ЦКП – 441429, <http://ckp-rf.ru/ckp/441429/>).

Для выращивания перевиваемых культур клеток CRFK, FS применяли питательные среды Игла-МЕМ (Биолот), содержащие антибиотики ципрофлоксацин и амфотерицин В в конечной концентрации 10 мкг/мл и 5 ЕД/мл соответственно. В ростовую среду для культивирования клеток добавляли 10 % фетальной сыворотки крови КРС (FBS, HyClone, USA), а в поддерживающую для выращивания вирусов – 2 % FBS.

Пермиссивность культур клеток к вирусу исследовали путем заражения клеток парвовирусом штамм «ЭС-95» при множественности заражения 0,1 – 0,01 ТЦД₅₀/клетку. Вирус 60 минут адсорбировали на клетки при температуре 37,0±0,5 °С, после чего в культуральные флаконы вносили поддерживающую среду с 2 % фетальной сыворотки крови КРС и культивировали 7 суток. Учитывали время наступления и характер ЦПД.

Инфекционную активность штамма «ЭС-95» парвовируса определяли титрованием в перевиваемых культурах клеток FS и CRFK. Для титрования готовили десятикратные его разведения (10⁻¹ до 10⁻⁵) в среде Игла-МЕМ. Каждое разведение вносили в 4 лунки. Планшеты инкубировали в СО₂-инкубаторе при 37,0±0,5 °С, ежедневно просматривая наличие ЦПД под световым микроскопом. Титрование вируса осуществляли в трех повторностях, окончательный результат учитывали через 7 суток. Титр вируса вычисляли по методу Рида и Менча и выражали в ТЦД₅₀/см³ [8].

Гемагглютинирующую активность штамма «ЭС-95» парвовируса контролировали с использованием эритроцитов поросенка. Для постановки реакции гемагглютинации готовили двукратные

разведения вирусосодержащего материала от 1:2 до 1:1024 в стерильном физиологическом растворе (рН 6,8 – 7,0). В первую лунку планшета вносили равный объем вируса, трехкратно пипетировали и переносили 0,05 см³ во вторую лунку и т.д. Из последней лунки удаляли 0,05 см³. После разведения вируса во все лунки добавляли 1%-ную суспензию эритроцитов в объеме, равном исходному объему физиологического раствора (0,05 см³). Планшеты встряхивали и оставляли при комнатной температуре 18 – 20 °С. Реакцию учитывали через 60 – 90 мин. Контролем эритроцитов на спонтанную гемагглютинацию служили две лунки с эритроцитами и физиологическим раствором (в равных объемах). РГА оценивали положительно при оседании эритроцитов в виде хорошо выраженного «зонтика», а отрицательно – в виде «пуговки». За титр гемагглютинирующей активности вируса принимали его наибольшее разведение, дающее четко выраженную агглютинацию в виде «зонтика» [8].

Идентификацию парвовируса штамм «ЭС-95» проводили методом ПЦР по амплификации фрагмента гена VP2 согласно протоколу, предложенному С.А. Pereira et al. [21].

Нуклеотидное секвенирование осуществляли с помощью генетического анализатора «Нанофор-05» (НПО «Синтол», Россия) и набора терминаторов BigDye v.3.1 (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя.

Филогенетическое древо было построено методом Maximum Likelihood. Достоверность ветвей оценивали bootstrap методом (1000 повторов) в программе MegaX.

Результаты исследований и обсуждение. Пермиссивность клеток к вирусным патогенам – одно из основных биологических свойств клеточных культур,

применяемых в вирусологических целях и определяющих возможности изоляции вируса, накопления вирусосодержащего материала и установления его инфекционной активности. Первичные культуры клеток, полученные из тканей клинически здоровых доноров, тем не менее, находятся в зоне риска как эндогенной, так и экзогенной вирусной контаминации, в связи с этим в данных экспериментах мы использовали перевиваемые линии клеток почки кошки (CRFK) и селезенки кошки (FS).

Согласно паспортным данным изучаемый вирус выделили из материала, полученного от щенка больного атипичной формой парвовирусного энтерита с использованием первичной культуры почек

котят. Адаптацию вируса к репродукции в данных клеточных культурах и оптимизацию условий его культивирования для получения высокоактивного вирусного материала проводили в течение трех последовательных пассажей. Характер развития цитопатического эффекта в перевиваемых линиях клеток CRFK и FS при множественности заражения 0,1 – 0,01 ТЦД₅₀/клетка представлен на рисунке 1.

Культуральный вирусный материал подвергали трехкратному замораживанию и оттаиванию и использовали при проведении следующего пассажа вируса. В каждом пассаже определяли инфекционную и гемагглютинирующую активность, а также подтверждали аутентичность вируса методом ПЦР.

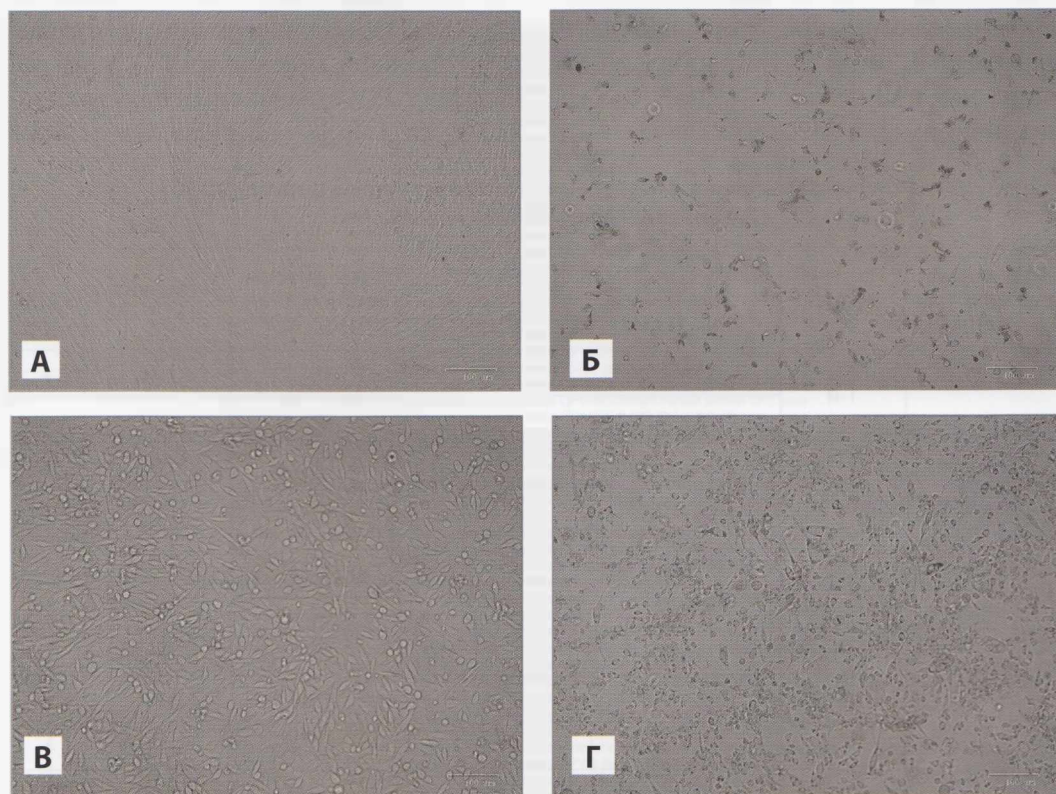


Рис. 1. Цитопатическое действие вируса парвовирусного энтерита собак в перевиваемых культурах клеток из тканей семейства кошачьих (CRFK и FS):
А – контрольная культура клеток CRFK 8-й пассаж; Б – культура клеток CRFK 8-й пассаж на 7-е сутки после заражения; В – контрольная культура клеток FS 8-й пассаж; Г – культура клеток FS 8-й пассаж на 7-е сутки после заражения (увеличение ×100)

Анализ представленных в таблице данных показал, что из двух исследованных культур клеток наибольшей перmissивностью к вирусу обладала перевиваемая линия клеток селезенки кошки (FS) как по инфекционной активности, так и по результатам реакции гемагглютинации. Наступление ЦПД в этих культурах наступало спустя 72 – 96 ч после инфицирования, причем в первом пассаже вируса в культуре клеток CRFK цитопатический эффект не наблюдали. Размножение в данных культурах клеток сопровождалось развитием диффузной зернистости клеток, округлением и отслоением их от монослоя, однако полная деструкция клеточного монослоя отсутствовала.

N. Decaro, C. Buonavoglia также отмечали незначительное или слабовыраженное ЦПД вируса CPV-2 в различных клеточных линиях после 4 дней заражения, например в культуре клеток A-72,

причем полную деструкцию клеток регистрировали при инфицировании вирусом только с высокой множественностью заражения [13]. Следует отметить, что и близкородственный вирус панлейкопении кошек (вакцинный штамм «А») в культуре клеток CRFK накапливался лишь до инфекционной активности 3,5 – 4,5 ЦПД₅₀/см³ [2].

Гемагглютинирующая активность вируса в культурах CRFK и FS достигала 1:16 – 1:32 и 1:64 – 1:128 соответственно. При титровании вируса цитопатический эффект наблюдали только в первых двух разведениях для культуры клеток CRFK, инфекционная активность составляла 1,5 – 1,75 Ig ЦПД₅₀/см³. В клеточной линии FS ЦПД регистрировали в более высоких разведениях, где титр достигал 3,0 ТЦД₅₀/см³. В разведениях, в которых отсутствовали признаки ЦПД, при постановке РГА отмечали оседание эритроцитов в виде «зонтика», а из лунок,

Результаты оценки репродукции парвовируса собак штамм «ЭС-95» в перевиваемых линиях клеток, n=3

| Наименование культуры клеток | Пассажный уровень | Множественность заражения, ТЦД ₅₀ /клетка | Время наступления ЦПД, ч | Инфекционная активность, Ig ЦПД ₅₀ /см ³ | Активность в РГА, ГАЕ | ПЦР |
|------------------------------|-------------------|--|--------------------------|--|-----------------------|-----|
| CRFK | 1-й | 0,1 – 0,01 | 96 | 0 | 1:16 | + |
| | | 0,01 – 0,001 | – | 0 | н/и | + |
| | 2-й | 0,1 – 0,01 | 96 | 1,5 | 1:32 | + |
| | | 0,01 – 0,001 | – | 0 | н/и | + |
| | 3-й | 0,1 – 0,01 | 96 | 1,75 | 1:32 | + |
| | | 0,01 – 0,001 | – | 1,5 | 1:32 | + |
| FS | 1-й | 0,1 – 0,01 | 96 | 2,5 | 1:128 | + |
| | | 0,01 – 0,001 | 96 | 2,5 | 1:64 | + |
| | 2-й | 0,1 – 0,01 | 72 | 3,0 | 1:128 | + |
| | | 0,01 – 0,001 | 96 | 2,5 | 1:64 | + |
| | 3-й | 0,1 – 0,01 | 72 | 3,0 | 1:128 | + |
| | | 0,01 – 0,001 | 72 | 2,75 | 1:64 | + |

Примечания. «–» – Отрицательный результат, «+» – положительный результат, «н/и» – не исследовали.

служивших контролем культуры клеток, – в виде «пуговики».

Вирусный геном парвовируса собак состоит из 5,2 КБ одноцепочечной линейной ДНК с негативной полярностью с двумя основными открытыми рамками считывания [12]. Одна из них кодирует неструктурные белки NS1 и NS2, тогда как вторая – структурные белки VP1 и VP2, которые и образуют вирусный капсид [20]. Установлено, что VP2 играет основную роль в антигенности и специфичности к хозяину CPV, поскольку 90 % капсида состоит из VP2 и мутации гена VP2 являются основными источниками появления различных антигенных вариантов вируса [11].

Для определения нуклеотидной последовательности изучаемого гена ис-

пользовали те же специфические олигонуклеотиды, что и для проведения ПЦР. Полученную последовательность фрагмента гена штамма «ЭС-95» анализировали с помощью Интернет-ресурса BLASTN. Для построения филогенетического дерева использовали доступные последовательности VP2 гена различных генетических линий вируса, представленные в GenBank, и алгоритм Maximum Likelihood. (рис. 2).

Достоверность ветвей оценивали bootstrap методом (1000 повторов) в программе MegaX. Штамм «ЭС-95» (ES-95) отмечен на рисунке 2 красным треугольником (GenBank Ass. № PP525236.1). Последовательности штаммов, применяемых для сравнения,

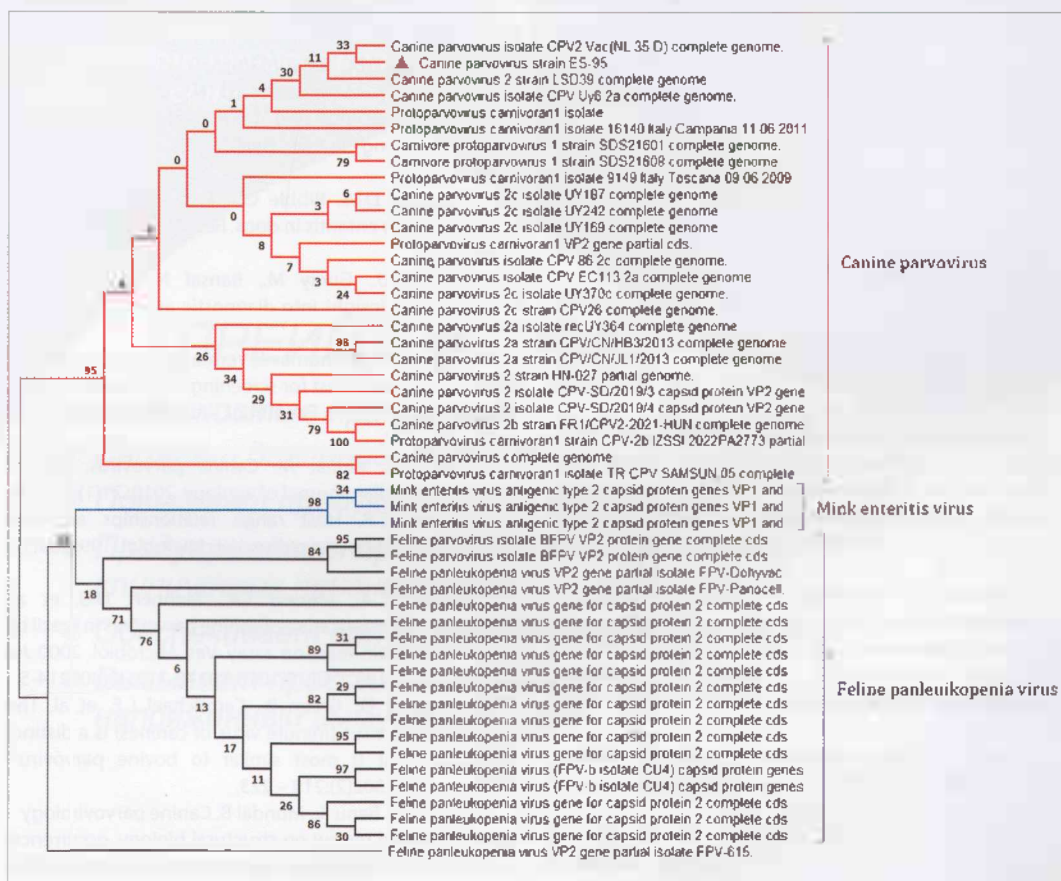


Рис. 2. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе последовательностей фрагмента гена VP2 парвовируса плотоядных

получили из международной базы данных Genbank.

На основании результатов секвенирования и последующего филогенетического анализа установили, что исследованный вирус (штамм «ЭС-95») относится к *Canine parvovirus* (парвовирус собак) и формирует отдельный кластер совместно с изолятами вирусов, выделенными от собак на «свободном выгуле» в Канаде, Уругвае и Италии.

Заключение. Изученный штамм «ЭС-95» парвовирусного энтерита собак репродуцируется в перевиваемых культурах клеток CRFK и FS и вызывает ЦПД при заражении в больших дозах, накопление вируса в этих линиях клеток достигает $1,5 - 3,0 \text{ Ig TCD}_{50}/\text{см}^3$. Вирус обладает невысокой гемагглютинирующей активностью, которая составляет $1:16 - 1:128$. По результатам секвенирования и филогенетического анализа исследуемый штамм отнесен к парвовирусу собак (CPV-2).

ЛИТЕРАТУРА

1. Астраханцев В.И., Данилов Е.П., Панков В.А., Кондаков Т.А. и др. Болезни собак. Под ред. С.Я. Любашенко. М.: Колос, 1988; 327 с.
2. Балышев В.М., Вишняков И.Ф., Федорищев И.В. и др. Вакцина против чумы, инфекционного гепатита и парвовирусного энтерита плотоядных: Пат. № 2154496 Российская Федерация. № 97121184/13: заяв. 04.12.1997; опубл.: 20.08.2000. Бюл. № 23. 9 с.
3. Кошляк В.В., Канкалова А.В. Породная предрасположенность собак к парвовирусному энтериту, терапевтическая и экономическая эффективность схем лечения. Международный научно-исследовательский журнал. 2022; 1(115). DOI:<https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.115.1.048>
4. Лабазов И.В., Устьянцев Д.А., Махно Е.А. и др. Патоморфологическая диагностика инфекционных заболеваний животных на примере диагностики парвовирусного энтерита собак и кошек (панлейкопения). Ветеринарная патология. 2022; 10:25690. VETPAT. 2022; 98.44.004.
5. Лакеев Е.М. Профилактика и лечение наиболее распространенных инфекционных заболеваний собак. Ростов-на-Дону: Пентагон, 1995; 125 с.
6. Полковниченко А.Л., Захаркина Н.И. Эффективность препарата Ронколейкин в качестве адьюванта вакцины против парвовирусной инфекции собак. Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2017; 150 - 153.
7. Старов С.К., Герасимова Н.И., Фомина Т.А. и др. Штамм № r-72 ВНИИЗЖ парвовируса собак для изготовления диагностических и вакцинных препаратов: Пат. №2242994 Российская Федерация. № 2003124490/13: заяв. 05.08.2003; опубл.: 27.12.2004. 10 с. Режим доступа: https://patents.s3.yandex.net/RU2242994C1_20041227.pdf
8. Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Фомина Н.В. Ветеринарная вирусология. Москва: Колос, 1984; 376 с.
9. Юрков С.Г., Колбасова О.Л. и др. Каталог коллекции клеточных культур ВНИИВВиМ. Покров, Россельхозакадемия, ВНИИВВиМ, 2010; 89 с.
10. Black J.W., Holscher M.A., Powell H.S. et al. Parvoviral enteritis and panleucopenia in dogs. J. Med. Small Anim. Clin. 1979; 74:47 - 50.
11. Cavalli A., Martella V., Desario C. et al. Evaluation of the antigenic relationships among canine parvovirus type 2 variants. Clin. Vaccine Immunol. 2008; 15(3):534 - 539.
12. Chinchkar S.R., Mohana S.B., Hanumantha R.N. et al. Analysis of VP2 gene sequences of canine parvovirus isolates in India. Arch Virol. 2006; 151(9):1881 - 1887.
13. Decaro N., Buonavoglia C. Canine parvovirus - a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. Vet. Microbiol. 2012; 155(1):1 - 12.
14. Glickman L.T., Domanski L.M., Patronek G.J. et al. Breed-related risk factors for canine parvovirus enteritis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1985; 187(6):589 - 594.
15. Hematian A., Sadeghifard N., Mohebi R. et al. Ghafourian Traditional and modern cell culture in virus diagnosis Osong Public Health Res. Perspect. 2016; 7(2):77 - 82.
16. Houston D.M., Ribble C.S. Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs. Res. Am. Vet. Med. Assoc. 1996; 1 - 3.
17. Lambe U., Guray M., Bansal N. et al. Canine Parvovirus- an insight into diagnostic aspect. J. Exp. Biol. 2016; 4:35.
18. Muthuraj P.G., Thomas J., Verma S. et al. Usefulness of haemagglutination test for screening of canine parvovirus infection in dogs J. Immunol. Immunopathol. 2016; 18(2):144 - 147.
19. Nandi S., Kumar M. Canine parvovirus: current perspective. Indian Journal of virology. 2010; 21(1):31 - 44.
20. Parrish C.R. Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. Vet. Microbiol. 1999; 69(1 - 2):29 - 40.
21. Pereira C.A., Monezi T.A., Mehnert D.U. et al. Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. Vet. Microbiol. 2000 Jul 31; 75(2):127 - 133. DOI:10.1016/S0378-1135(00)00214-5.
22. Schwartz D., Green B., Carmichael L.E. et al. The canine minute virus (minute virus of canines) is a distinct parvovirus that is most similar to bovine parvovirus. Virology. 2002; 302(2):219 - 223.
23. Tuteja D., Banu K., Mondal B. Canine parvovirology - A brief updated review on structural biology, occurrence, pathogenesis, clinical diagnosis, treatment and prevention. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases Volume 82. March 2022. DOI.org/10.1016/j.cimid.2022.101765



ШЕЛКОВСКИЙ
БИОКОМБИНАТ

Создавая здоровое будущее!



РЕСВАК

Вакцина против
репродуктивно-респираторного
синдрома свиней



ПРЕИМУЩЕСТВА

- Надёжность в применении
- Снижает давление инфекции
- Повышает продуктивность фермы
- Предупреждает проявление респираторных клинических признаков РРСС
- Обеспечивает получение здорового потомства
- Вызывает продолжительный (не <7 мес.) напряженный иммунный ответ



www.biocombinat.ru



E-mail: comerc@biocombinat.ru



+7 495 134-58-85

ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТИВИРУЕМОГО ШТАММА *TRYPANOSOMA EQUIPERDUM*

Светлана Валерьевна Алексеенкова, к.б.н., ведущий научный сотрудник,
и.о. заведующей лабораторией, a97865342a@yandex.ru

Виктория Васильевна Стаффорд, к.б.н., ведущий научный сотрудник,
и.о. заведующей сектором, v.v.stafford.viev@mail.ru

Максим Николаевич Лощинин, к.в.н., ведущий научный сотрудник,
viev.lmn@mail.ru

ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН» (г. Москва, Россия)

Случайная болезнь, вызываемая *Trypanosoma equiperdum*, – одна из трипаносомозов у лошадей. Клиническое течение длительное от одного-двух месяцев до нескольких лет. Поскольку патогенез случайной болезни еще не выяснен, необходимы экспериментальные исследования с использованием лабораторных моделей. Мыши обычно не восприимчивы к большинству штаммов *T. equiperdum*, но некоторые из них для мышей патогенны. В настоящем исследовании у мышей, инвазированных штаммом *T. equiperdum* «Альфорт», в течение 7 дней развивалась паразитемия. При гистологическом исследовании паразитов обнаружили преимущественно в просвете кровеносных сосудов, при этом наблюдали некротический сплениит, гломерулонефрит, развитие гидропической дистрофии печени, портальный гепатит, интерстициальную пневмонию и отёк головного мозга, что может служить признаком развития транзиторной паразитемии на фоне нарушения гемодинамики трофических сосудов в органах экспериментальных животных. Результаты тестирования биологических свойств штамма «Альфорт» показали, что он проявляет таксономические признаки, одновременно свойственные *T. equiperdum* и *T. evansi* и, возможно, относится к гибридным штаммам *Trypanosoma* spp. группы трипанозоон. В статье обсуждаются гипотезы эволюции видов трипаносом лошадей и необходимость реклассификации коллекционных штаммов. **Ключевые слова:** лошадь, трипаносома, случайная болезнь, сурра, гистологическое исследование, лабораторная модель.

Characteristic of trypanosoma equiperdum strain

S.V. Alexeyenkova, PhD in Biology, Head of the laboratory

V.V. Stafford, PhD in Biology, Head of the sector

M.N. Loschinin, PhD in Veterinary Science, Leading researcher

All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Skryabin
and Y.R. Kovalenko (Moscow, Russia)

Dourine caused by infection with *Trypanosoma equiperdum* is one of the trypanosomiasis in horses. The clinical course is long-term, from 1 – 2 months to several years. Since the pathogenesis of the dourine has not yet been clarified, experimental studies using laboratory models are needed. Mice are usually not susceptible to most strains of *T. equiperdum*, but some strains are pathogenic to them. Mice susceptible to infection show transient parasitemia rapidly and die within 2 – 8 days after inoculation of the parasite into the body. In the present study, mice infected with the *T. equiperdum* «Alfort» strain developed parasitemia during an experimental period of 7 days. Histological examination revealed parasites mainly in the lumen of blood vessels, while necrotic splenitis, glomerulonephritis, the development of hydropic liver dystrophy, portal hepatitis and interstitial pneumonia, and cerebral edema were observed, which may be a sign of the development of transient parasitemia against the background of impaired hemodynamics of trophic vessels in the organs of experimental animals. The results of a study of the biological properties of the «Alfort» strain showed that it exhibits taxonomic features simultaneously characteristic of *T. equiperdum* and *T. evansi* and possibly belongs to hybrid strains of *Trypanosoma* spp. of the Trypanozoon group. The article discusses hypotheses of the evolution of equine trypanosome species and the need for reclassification of collection strains. **Key words:** horse, trypanosoma, dourine, surra, histological method, laboratory model.

DOI: 10.30896/0042-4846.2025.28.6.32-38

Trypanosoma brucei rhodesiense, *T. b. gambiense*, *T. b. brucei*, *T. evansi* и *T. congolense* – возбудители трипаносомоза у людей и домашнего скота [5, 7]. Одним из трипаносомозов у лошадей является случайная болезнь, вызываемая *T. equiperdum* [8], по данным ВОЗЖ, ее регистрируют в Южной Африке, на юге Западной Ев-

ропы, в Южной Америке, КНР, на Среднем Востоке, в Средней Азии (Киргизии, Узбекистане) и России (Сибири). У лошадей она протекает очень тяжело, со смертностью 30 – 50 % [6]. При этом у них наблюдают отек наружных половых органов, кожные бляшки и неврологические признаки в течение длительного периода – от одного-двух месяцев до нескольких лет [8]. Однако, патогенез остается до сих пор неизвестным.

Несмотря на то что лабораторные животные не являются естественными хозяевами указанных выше трипаносом, на сегодняшний день с их участием созданы различные многогранные модели для изучения патогенеза заболевания [4]. Известно, что мыши не восприимчивы к штаммам *T. equiperdum*, за редким исключением, но, если инфицирование произошло, то у них быстро развивается транзиторная паразитемия и наступает летальный исход в течение 2 – 8 дней [9]. Штамм *T. equiperdum*, который заражает мышей и вызывает длительное клиническое течение у лошадей, пораженных случной болезнью, до сих пор не установлен.

Цель работы – изучить биологические свойства культивируемого штамма *Trypanosoma equiperdum* «Альфорт» для поиска новых закономерностей, упрощающих определение таксономического положения трипаносом группы трипанозоон.

Материалы и методы. В работе использовали беспородных самок белых мышей в возрасте 4 месяца ($n=10$) из вивария ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА им. К.И. Скрябина. Все методы выполняли в соответствии с Международными принципами для биомедицинских исследований с участием животных, утвержденными Советом международных организаций медицинских наук (Женева, 1985). Штамм «Альфорт» *T. equiperdum*

был получен в Национальной ветеринарной школе Мэзон-Альфорт (Франция) и передан в 1996 г. в Референтную лабораторию МЭБ на базе лаборатории протозоологии ВИЭВ. В России он имеет другое название – штамм *Trypanosoma equiperdum*, НПО «Биоцентр», и используется как культура паразитических простейших для изготовления специфического трипаносомного диагностикума в РСК и РДСК [3]. Мышам опытной группы внутрибрюшинно вводили 0,1 мл фосфатно-солевого раствора pH 7,2, содержащего трипаносомы в концентрации 1×10^6 , а контрольной ($n=5$) – внутрибрюшинно стерильный фосфатно-солевой буферный раствор в том же объеме.

Перед выполнением паразитологического исследования животных анестезировали ингаляционным методом при помощи 2%-ного раствора изофлурана. Затем из хвостовой вены на 3-и, 5- и 7-е сутки отбирали кровь по 0,15 мл. Уровень паразитемии рассчитывали по количеству паразитов в одном поле зрения микроскопа при увеличении в 2000 раз. Образцы крови мышей исследовали методом висячей капли, готовили тонкие мазки и окрашивали их по методу Романовского–Гимзе. Экспериментальный период составил 7 дней.

Для комплексного тестирования отбирали пробы печени, селезенки, почек, сердца, пищевода, поджелудочной железы и головного мозга. Образцы помещали в 10%-ный раствор забуференного формалина, фиксировали не менее 48 ч. Для их обработки использовали полуавтоматическое оборудование фирмы *Thermo Scientific* карусельного типа. Парафиновые блоки нарезали на микротоме *Microm* толщиной 5 микрон. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином. Гистоархитектонику препаратов оценивали при помощи микроскопа *Axio A1.0*, фо-

тосъемку вели, используя программу AxioVision.

Результаты исследований и обсуждение. В мазках крови наблюдали экстрацеллюлярных паразитов веретенообразной формы, размером 12,0 – 28,0 мкм в длину и 1,4 – 2,6 мкм в ширину, локализирующихся в плазме крови. При микроскопии окрашенных препаратов хорошо различимо центрально расположенное ядро, кинетопласт (базальное тело), жгутик, который окаймляет ундулирующую мембрану (рис. 1).

При исследовании крови мышей методом висячей капли визуально определяли уровень паразитемии и подвижность трипаносом, начиная с трех суток после заражения. На 5-е сутки уровень паразитемии составлял 30 – 40 трипаносом в одном поле зрения микроскопа при увеличении в 2000 раз, а к 7-м суткам – увеличивался до 100 паразитов в одном поле зрения микроскопа.



Гистологическое изучение показало, что патологические изменения в исследуемых образцах органов мышей были схожи с некоторым исключением. Так, в паренхиме поджелудочной железы инвазированных мышей была сохранена гистоархитектоника. Островки Лангерганса с четкими границами, панкреатические ацинусы функционально активны, границы клеток выражены. В просвете кровеносных сосудов находятся веретеновидные, базофильные, одноклеточные организмы, а в просвете сосудов мелкого калибра наблюдали агглютинацию эритроцитов с примесью фрагментов паразитов.

В пробах лёгкого установили утолщение интерстициальной ткани альвеол, в результате инфильтрации лимфоцитами (рис. 2, А), в области крупных вен визуализировались обширные кровоизлияния с выпотом гемосидерина (рис. 2, Б), в просвете сосудов и альвеол в состоя-

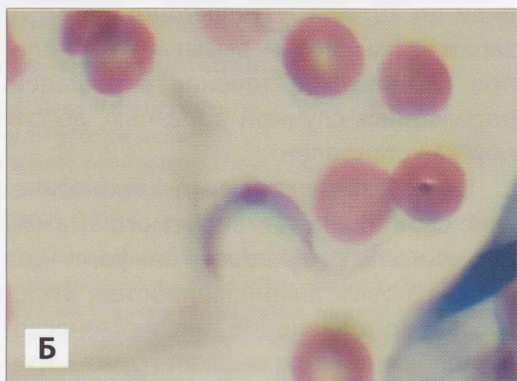


Рис. 1. Мазок крови мыши с *T. equiperdum*: А – трипаносомы среди эритроцитов (x2000); Б – деталь рисунка А при крупном увеличении (x10000), окраска по Романовскому–Гимзе

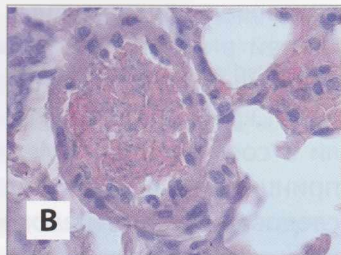
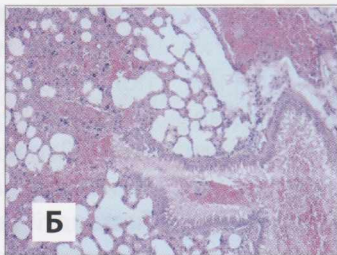
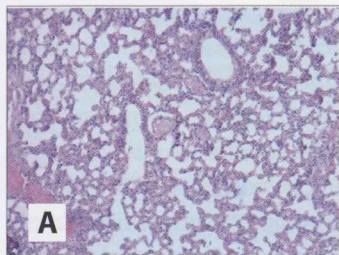


Рис. 2. Лёгкое мыши: А – общий вид паренхимы (x100); Б – кровоизлияние с гемосидерином (x100); В – просвет альвеолы с агглютинированными эритроцитами и *Trichomonas spp.* (x630), окраска гематоксилином и эозином

нии окклюзии эритроцитами выявлена масса базофильных, веретеновидных объектов (рис. 2, В).

Трипаносомы хорошо визуализируются и в просвете пищевода при артериальном кровоизлиянии (послеубойное), однако гистоархитектоника стенки пищевода не изменена.

В почках выявили гломерулонефрит и гиперемию (рис. 3, А), гломерулит юкстамедуллярных клубочков (рис. 3, Б) и некроз эпителия извитых канальцев (рис. 3, В). Местами лизис цитоплазмы кубического эпителия с кариопикнозом, пространство капсулы Шумлянского-Боумана отсутствовало, что может свидетельствовать о развитии отёка почечного тельца. Иногда отмечали очаги кровоизлияний в интерстициальную ткань и гиперемию кровеносных сосудов.

Гистоархитектоника селезёнки отличалась у каждой мыши, в одном случае регистрировали угнетение функции дифференцировки иммунокомпетентных клеток, выражающееся в отсутствии герминативных центров в лимфоидных фолликулах белой пульпы. При этом границы фолликулов были сохранены, внешняя граница представлена макрофагами и лимфоцитами, тогда как внутренний клеточный компонент – в большей степени лимфоцитами. Красная пульпа обильно инфильтрирована эритроцитами, местами отмечали бластные клетки и мегакариоциты. В другом случае выявили обширные участки субкапсулярного

некроза клеток, в цитоплазме клеток соединительной ткани стромальной части наблюдали вакуолизацию цитоплазмы. Белая пульпа с неровными границами, преимущественно с лимфоидными фолликулами I типа, имела вид «звёздного неба», по типу неходжскинской лимфомы. В красной пульпе регистрировали клеточный петрификат и обилие полиморфных клеток: малые лимфоциты неправильной формы, бластные клетки с гигантским и гиперхромным ядром.

Миокард компактный, диффузно инфильтрирован лимфоцитами, в мышечной ткани местами наблюдали ложемент с лизированными эритроцитами и базофильными включениями, по всей видимости, в состоянии лизиса, перифокально без клеточной реакции. Коронарные сосуды гиперемизированы, в их просвете множество базофильных мелких телец, располагающихся между массой эритроцитов, при этом поперечная исчерченность сохранена.

В печени отмечали гиперемию кровеносных сосудов, преимущественно портальных, в просвете центральных вен – веретеновидные, базофильные тельца и нейтрофилы, периваскулярно выраженную лимфоидноклеточную инфильтрацию. В гематолимфатических протоках обилие лимфоцитов, балочность паренхимы печени не выражена. В некоторых случаях регистрировали локусы гепатоцитов с крупнокапельной вакуолизацией цитоплазмы и кариорексисом.

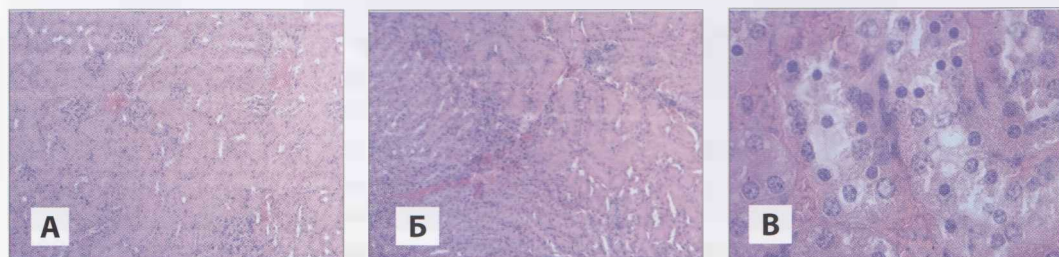


Рис. 3. Почка мыши: А – гломерулонефрит и гиперемия (х100); Б – юкстамедуллярная область (9 х100); В – кариопикноз и лизис цитоплазмы эпителия канальцев (х630), окраска гематоксилином и эозином

В головном мозге выявили периваскулярный отек (рис. 4, А), грушевидные клетки Пуркинье были неправильной формы (рис. 4, Б), наблюдали кариолизис клеток макроглии (рис. 4, В).

T. equiperdum инвазирует лошадей и вызывает случайную болезнь. Клиническое течение ее от одного-двух месяцев до нескольких лет [8]. В данном эксперименте у инвазированных мышей наблюдали паразитемию в течение всего срока и на 6 – 7-е сутки все животные погибали. При гистологическом исследовании *T. equiperdum* обнаружили преимущественно в просвете кровеносных сосудов, при этом наблюдали некротический спленит, гломерулонефрит, гидрорическую дистрофию печени, портальный гепатит и интерстициальную пневмонию, отёк головного мозга. Что может служить признаком не только развития транзиторной паразитемии, но и патологии органов, вследствие нарушения гемодинамики трофических сосудов.

Считают, что среди лошадей *T. equiperdum* передается, проникая в слизистую оболочку половых органов, и через кровоток переносится во внутренние органы [8]. В настоящем исследовании трипаносомы вводили внутрибрюшинно и впоследствии их обнаружили в периферической крови. Возможно, это свидетельствует о том, что паразиты способны преодолевать тканевой барьер и с

током крови разноситься по всему организму. Хотя путь заражения отличался от естественного заражения лошадей, некоторые исследователи считают, что лабораторная модель с использованием мышей отражает патологическое состояние лошадей, пораженных случайной болезнью, с паразитемией. Другие авторы полагают, что смерть мышей, инфицированных *T. b. brucei*, *T. congolense* или *T. evansi*, была вызвана системным воспалительным ответным синдромом (SIRS), почечной недостаточностью, анемией или проникновением паразитов в центральную нервную систему [13]. В этих исследованиях также отмечали наличие гломерулонефрита и отека головного мозга.

Клинические признаки, наблюдаемые у лошадей со случайной болезнью, включают локальный отек половых органов и молочных желез, кожные бляшки, анемию и неврологические признаки, такие как паралич задних конечностей и лицевых мышц [8]. У мышей BALB/c и C57BL/6, инвазированных штаммом *T. equiperdum* IVM-t2, регистрировали тяжелый экстрамедуллярный гемопоэз, следовательно, у них могла развиться анемия [11]. Гистопатологически обнаруженные кожные бляшки у лошадей, описанные как «талерные бляшки» или «трипаносомный песок», характеризуются наличием паразитов и сильным воспалением в дерме [8]. Их никогда не

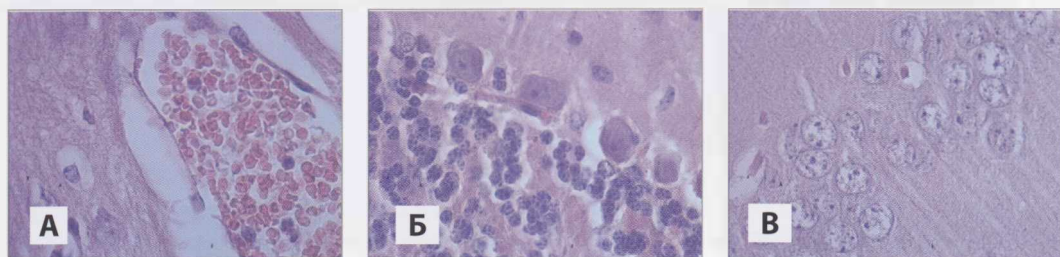


Рис. 4. Головной мозг мыши: А – нейтрофилы и *Trypanosoma* spp. в просвете кровеносного сосуда, экстравазатный отёк; Б – ганглионарный слой мозжечка (4 крупные клетки); В – кариорексис ядер глиальных клеток (гематоксилин и эозин, х630)

воспроизводили у экспериментальных животных, однако у мышей C57BL/6 наблюдали покраснение и алопецию кожи спины, а также наличие паразитов и воспаление в дерме и подкожной клетчатке [13], что на гистопатологическом уровне похоже на «трипаносомный песок».

Изучение патогенеза случной болезни в опытах на лабораторной модели показало частичное сходство с изменениями, наблюдаемыми у лошадей при естественной инвазии, и еще большее сходство с суррой (*T. evansi*). Имеется ряд противоречий, допускающих альтернативное таксономическое положение некоторых штаммов возбудителя случной болезни, в том числе штамма «Альфорт». Трипаносомы лошадей *T. brucei*, *T. evansi* и *T. equiperdum* относят к классу кинетопластыды, группы трипанозоон [1]. Морфологически *T. brucei* можно отличить от других таксонов по плеоморфной природе трипомастигот, присутствующих у млекопитающего-хозяина. Возбудители сурры и случной болезни морфологически между собой не различимы. Отсутствие монофилии *T. equiperdum* и *T. evansi*, а также их незначительные генетические отличия от *T. brucei* привели к попытке классифицировать их как подвиды или штаммы *T. brucei*.

Другие исследователи предложили гипотезу о том, что многие так называемые изоляты *T. equiperdum* на самом деле являются ошибочно идентифицированными штаммами *T. evansi* и что *T. equiperdum* и *T. evansi* эволюционировали как минимум двумя путями отдельно от *T. brucei*. Все кинетопластыды группы трипанозоон содержат кинетопласт из 5000 – 10000 кольцевых молекул ДНК (мини-колец) размером около 1000 п.о., расположенных внутри митохондрий. На основании различий структуры мини-колец в настоящее время

вид *T. evansi* подразделяют на типы – А и В. *T. equiperdum* представлена пока одним типом. Однако, недавно во время вспышки случной болезни в Италии и Монголии изолировали необычные штаммы возбудителя, которые могут существенно усложнить таксономический анализ [10, 12]. Эволюция видов трипаносом не происходит мгновенно, поэтому отдельные штаммы могут одновременно демонстрировать таксономические признаки, свойственные разным видам. Так, например, известны гибридные штаммы, в таксономическом положении которых ученые не могут прийти к единому мнению. По этой причине только один штамм «OVI» *T. equiperdum*, депонированный Ветеринарным институтом Ондерстепорт в ЮАР, принят ВОЗЖ в качестве эталонного для понимания патогенеза случной болезни. Именно этот штамм сейчас использует Европейская лаборатория по изучению болезней лошадей во Франции, Национальная лаборатория по изучению случной болезни в Германии и лаборатории национальных ветеринарных служб Министерства сельского хозяйства США [1]. Полученные ранее [2] результаты секвенирования и филогенетического анализа области миникольца кинетопласта штамма «Альфорт» свидетельствуют о том, что эти трипаносомы генетически близки виду *T. evansi*. Результаты согласуются с работами по исследованию других участков генома, в которых также наблюдали на дендрограммах разбросанность *T. equiperdum* среди обособленных групп *T. evansi* и *T. brucei* [6].

Заключение. Учитывая совокупные данные, и, несмотря на наличие штамма «OVI», многие исследователи ставят под сомнение существование *T. equiperdum* как самостоятельного вида. Имеющиеся в коллекциях лабораторий штаммы

T. equiperdum и *T. evansi*, вероятно, нуждаются в детальном исследовании биологических свойств и реклассификации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ по заданию НИР - FGUG-2025-0004.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеевкова С.В. Проблемы дифференциальной диагностики трипаносомозов лошадей: наганы, сурры и случной болезни. Ветеринария. 2021; 12:35 – 39.
2. Ломкина Н.Ф., Георгиу Х., Заблоцкий В.Т., Гулюкин М.И., Тюрейтер Л. Изучение генома возбудителей трипаносомозов лошадей (*T. equiperdum* и *T. evansi*). Ветеринария. 2013; 3:29 – 33.
3. Тимофеев Б.А., Эпельдимов Р.Х. Штамм трипаносом *Trypanosoma equiperdum*, НПО «Биоцентр», как культура паразитических простейших для изготовления специфического трипаносомного диагностикума в РСК и РДСК. Патент на изобретение. 2001; RU2193595C1.
4. Antoine-Moussiaux N., Mages S., Desmecht D. Contributions of experimental mouse models to the understanding of African trypanosomiasis. Trends Parasitol. 2008; 24:411 – 418.
5. Buscher P., Cecchi G., Jamonneau V., Priotto G. Human African trypanosomiasis. Lancet. 2017; 390:2397 – 2409.
6. Claes F., Buscher P., Touratier L., Goddeeris B.M. *Trypanosoma equiperdum*: master of disguise or historical mistake? Trends Parasitol. 2005; 21(7):316 – 321.
7. Giordani F., Morrison L. J., Rowan T. G., DE Koning H. P., Barrett M.P. The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. Parasitology. 2016; 143:1862 – 1889.
8. Gizaw Y., Megersa M., Fayera T. Dourine: a neglected disease of equids. Trop. Anim. Health Prod. 2017; 49:887 – 897.
9. Hagos A., Goddeeris B. M., Yilkal K., Alemu T., Fikru R., Yacob H. T., Feseha G., Claes F. Efficacy of Cymelarsan and Diminazan against *Trypanosoma equiperdum* infections in mice and horses. Vet. Parasitol. 2010; 171:200 – 206.
10. Pascucci I., Di Provvio A., Camma C., Di Francesco G., Calistri P., Tittarelli M., Ferri N., Scacchia M., Caporale V. Diagnosis of dourine in outbreaks in Italy. Vet. Parasitol. 2013; 193:30 – 38.
11. Stijlemans B., De Baetselier P., Mages S., Van Genderachter J. A., De Trez C. African trypanosomiasis-associated anemia: the contribution of the interplay between parasites and the mononuclear phagocyte system. Front. Immunol. 2018; 9:218.
12. Suganuma K., Narantsatsral S., Battur B., Yamasaki S., Otgonsuren D., Musinguzi S.P., Davaasuren B., Battsetseg B., Inoue N. Isolation, cultivation and molecular characterization of a new *Trypanosoma equiperdum* strain in Mongolia. Parasites & Vectors. 2016; 9:481.
13. Tanaka Y., Suganuma K., Watanabe K., Yoshiyasu K. Pathology of female mice experimentally infected with an in vitro cultured strain of *Trypanosoma equiperdum*. J. Vet. Med. Sci. 2021; Aug 6; 83(8):1212 – 1218.

УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!

**НАПОМИНАЕМ ВАМ, ЧТО НАЧАЛАСЬ ПОДПИСКА
на 2-е полугодие 2025 г.
в местных отделениях связи**

**Индекс журнала «Ветеринария»
по каталогу ООО «УП УРАЛ-ПРЕСС» – 70130; подписка онлайн
и по каталогу в АО «Почта России» – индекс ПИ396.**

**На сайте Научной электронной библиотеки – eLIBRAR.RU
вы можете подписаться и приобрести
электронную версию журнала или отдельной статьи.**

**Базовая цена на журнал «Ветеринария»
без стоимости доставки и дополнительных услуг почты:**

на 1 мес – 550 руб.,

на 3 мес – 1650 руб.,

на 6 мес – 3300 руб.

Редакционная коллегия и редакция

ЦИФРОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ОБЛАСТИ ИДЕНТИФИКАЦИИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ

Евгений Алексеевич Гулюкин, аспирант, likesunn@mail.ru

ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН»
(109428, Россия, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, корп. 1)

Михаил Владимирович Арисов, д.в.н., профессор РАН, руководитель филиала, director@vniigis.ru
Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии
животных и растений – филиал ФГБНУ «ФНЦ – Всероссийский научно-исследовательский инсти-
тут экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН»
(117218, Россия, г. Москва, ул. Б. Черемушкинская, д. 28)

На территории России зарегистрировано 68 видов иксодовых клещей. Они особенно опасны, так как способны переносить возбудителей трансмиссивных заболеваний человека и животных – клещевой энцефалит, болезнь Лайма, геморрагическую лихорадку Крым-Конго, клещевой тиф Северной Азии, лихорадку Ку, туляремию, а также анаплазмозы и пироплазмозы сельскохозяйственных животных. Поэтому точное знание видового разнообразия клещей очень важно в практических целях. Для идентификации разработаны классические определители и таксономические ключи. Однако, их наличие в печатном формате – не самый удобный вариант использования на практике, есть сложности и для последующего обновления данных. По этой причине все чаще прибегают к переводу таксономических данных в электронный формат, а это возможно только с привлечением современных цифровых технологий. Авторы обобщили имеющиеся сведения по классическим каталогам-определителям по фауне России, привели примеры подобных работ в мире и показали направление развития и перспективность таксономической работы с привлечением цифровых технологий. **Ключевые слова:** иксодовые клещи, современная идентификация, каталоги определителей, морфологические характеристики, цифровые технологии.

Digital technologies in the field of tick identification

E.A. Gulyukin, Graduate student, likesunn@mail.ru

All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Skryabin and Ya.R. Kovalenko of the RAS
(Moscow, Russia)

M.V. Arisov, PhD in Veterinary Science, Professor of the RAS,
Branch manager, director@vniigis.ru

All-Russian Scientific Research Institute for Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plant –
a branch of the Federal Scientific Centre VIEV (28, Bolshaya Cheremushkinskaya st., Moscow, 117218, Russia)

There are 68 species of ixodid ticks registered in Russia. They are of particular importance in maintaining transmissible diseases of humans and animals, including tick-borne encephalitis, Lyme disease, Crimean-Congo hemorrhagic fever, tick-borne typhus of North Asia, Q fever, tularemia, as well as anaplasmosis and piroplasmiasis of farm animals. Therefore, accurate knowledge of the species diversity of ixodid ticks is very important for practical purposes. For this work, classical identifiers and taxonomic keys have traditionally been developed. However, their publication in printed format is not the most convenient option for practical use and subsequent data updating. Increasingly, taxonomic data are converted to electronic format, and this work is impossible without the use of modern digital technologies. In this work, the authors summarized the available data on classical catalogs-identifiers on the fauna of Russia, gave examples of similar works in the world and showed the prospects for the development of taxonomic work with the use of digital technologies. **Key words:** Ixodid ticks, modern identification, catalogues of identification tools, morphological characteristics, digital technologies.

DOI:10.30896/0042-4846.2025.28.6.39-43

Иксодовые клещи – временные эктопаразиты позвоночных животных, облигатные гематофаги, характеризующиеся длительным питанием на хозяине [7]. Представители иксодовых клещей (*Ixodidae*) распространены по всему миру, семейство насчитывает более 700 видов, собранных в 14 родов, число опи-

санных видов ежегодно увеличивается. На территории России, по данным Н.В. Цапко [14], зарегистрировано 68 видов иксодовых клещей шести родов: 31 вид рода *Ixodes*, 15 – рода *Haemaphysalis*, 7 – рода *Dermacentor*, еще 7 – рода *Rhipicephalus*, 6 – рода *Hyalomma* и 2 – рода *Amblyomma*. Представители

последнего известны по единичным находкам заносных на территорию России клещей [14, 19].

Особый интерес к иксодовым клещам вызван тем, что они служат переносчиками множества опасных возбудителей трансмиссивных заболеваний человека и животных [2, 3]. Из клещевых инфекций на территории России и сопредельных государств наибольшее медико-ветеринарное значение имеют клещевой энцефалит, болезнь Лайма, геморрагическая лихорадка Крым-Конго, клещевой тиф Северной Азии, лихорадка Ку, туляремия, а также анаплазмозы и пироплазмозы сельскохозяйственных животных. На сегодняшний день от собранных в природе иксодовых клещей выделили более 1000 вирусов, около 30 видов риккетсий, несколько видов бактерий, спирохет, трипаносом и филарий, а также около 200 пироплазмид. Еще большее количество возбудителей, передаваемых иксодовыми клещами диким животным, остаются не идентифицированными [2, 3, 4, 13, 16].

Неблагоприятная эпидемическая и эпизоотическая обстановка по природно-очаговым болезням, переносчиками которых являются иксодовые клещи, определяет важность точной их идентификации. Знания о биологическом разнообразии фауны иксодовых клещей необходимы для изучения взаимоотношений в ряду переносчик – возбудитель инфекции в очагах трансмиссивных болезней на территории России [14].

Во всем мире акарологи используют описательные ключи и иерархические диаграммы на бумажных носителях для идентификации видов. Их главное ограничение – сложность быстро пересматривать и дополнять данные, трудоемкость поиска информации [17]. Совершенствование эпизоотологического мониторинга переносчиков транс-

сивных болезней включает широкий спектр подходов и технологий: интеграцию традиционных методов с геоинформационными системами (ГИС), дистанционное зондирование, подключение нейронных сетей [3, 5, 6, 15, 16].

Принимая во внимание сказанное, цель настоящей работы – рассмотреть имеющиеся в России и мире определители иксодовых клещей, выявить перспективные направления их развития и усовершенствования.

Материалы и методы. Для подготовки данной статьи мы проанализировали различные источники информации: научные статьи, отчеты научных работ, материалы на интернет-ресурсах. Собранный материал систематизировали.

Результаты исследований и обсуждение. Определение видов иксодовых клещей базируется на таксономических признаках, главным образом морфологических (фенотипических). Используют также сведения об ареалах обитания клещей (Африка, Австралия, Россия и др.) или о видах животных прокормителей (паразиты птиц, грызунов и др.).

Таксономические определители можно классифицировать по следующим параметрам:

- модели данных, логике построения и алгоритму вывода: дихотомические, политомиические и иллюстративные;

- форме реализации техническими средствами: бумажные (печатные) и электронные (офлайновые, онлайн-вые, с использованием искусственного интеллекта – ИИ).

Различные модели данных могут быть реализованы в бумажном или электронном формате, системы с ИИ оперируют отдельными признаками или целыми изображениями.

Особо стоит отметить своеобразную современную возможность идентификации в социальных сетях или на спе-

циализированных порталах (например, iNaturalist), где в процесс определения включается целое экспертное сообщество.

Определители для идентификации иксодовых клещей в России

Печатные определители. В 1931 г. в томах серии «Определители по фауне СССР», издаваемые Зоологическим музеем Академии наук, вышел справочник Н.О. Оленева «Паразитические клещи Ixodoidea фауны СССР» на 131 странице. Главная цель того издания – привлечь внимание к иксодовым клещам, дав в руки научным сотрудникам и практикующим врачам инструмент для определения видов клещей по половозрелой стадии. В определитель были включены описания и рисунки, что являлось новым подходом в то время. Помимо этого, было описано становление систематического положения иксодид, история их изучения в царской России и в СССР [9].

В 1950 г. в серии «Фауна СССР» вышел том Б.И. Померанцева, посвященный иксодовым клещам Советского Союза. В него вошли ранние материалы, опубликованные автором, в том числе данные определителя «Клещи (семейства Ixodidae) СССР и сопредельных стран» 1946 г. На тот момент это был самый полный справочник по иксодовым клещам на территории СССР, имел оригинальный взгляд автора на систематику и определительные ключи. Издание богато иллюстрировано, в том числе рисунками самого Бориса Ивановича Померанцева [9].

Позже, в 1956 г. Г.В. Сердюковой издан определитель «Иксодовые клещи фауны СССР». От ранее изданных определителей издание отличалось наличием новых родовых определительных таблиц личинок и нимф, обновленных сведений по морфологии и биологии,

включая общую картину ландшафтной экологии клещей, перечня клещей по видам их хозяев [2].

Более современные данные по данным паразитам на территории России и прилежащих стран собраны в двух монографиях Н.А. Филипповой – по подсемейству Ixodinae и Amblyomminae [11]. В работах приведены морфологические описания, географическое распространение, паразито-хозяинные отношения и медицинское значение иксодовых клещей в границах СССР.

Широко известны монографии Ю.С. Балашова, в которых автор рассматривал представителей семейства Ixodidae, преимущественно с точки зрения их морфолого-физиологических особенностей, географического распространения, происхождения и эволюции, связей с хозяевами и взаимоотношения клещей с возбудителями клещевых инфекций. Определительные ключи в те издания не вошли.

Последующие работы современной России представлены отдельными публикациями. Одни из них описывали фауну клещей на территории РФ в целом, другие касались фауны отдельных регионов. Некоторые работы посвящены новым видам или обсуждению отдельных морфологических особенностей, имеющих значение при таксономическом определении [1, 8, 10, 12, 14, 24].

Электронные определители. В последние годы, наряду с классическими методами видовой идентификации, внедряют современные технологические подходы, значительно улучшающие и ускоряющие процесс распознавания и классификацию видов. Цифровые технологии открывают новые возможности, нейронные сети и машинное обучение позволяют анализировать большие объемы данных,

выявляя скрытые закономерности и предсказывая географическое распространение возбудителей. Геоинформационные системы (ГИС) предоставляют инструменты для визуализации данных о распространении заболеваний на карте. Дистанционное зондирование с использованием спутниковых и авиационных данных дает возможность провести мониторинг климатических условий и их изменений в окружающей среде, которые влияют на распространение клещей [3, 5].

Результатом многолетней работы G.V. Kolonin стало в 2009 г. размещение на сайте электронного каталога фауны иксодид мира с картами ареала распространения для каждого вида клеща [23].

В 2018 г. А.М. Коровкин провел опыт идентификации иксодовых клещей по фотографиям с использованием нейронных сетей AlexNet. Полученный точный результат определения позволяет рекомендовать использовать данную модель на практике [6].

Определители для идентификации иксодовых клещей в мире

Печатные определители. В мировой научной литературе много работ посвящено вопросу определения иксодовых клещей. Еще в 1896 г. Neumann выделил Ixodidae как семейство в отряде клещей и разделил его на два подсемейства: *Argasinae* и *Ixodinae*. В последующие годы (1901, 1902, 1904, 1907, 1911) ученый уточнял классификацию.

E. Jacob в 1923 г. подробно разобрал родственные отношения между родами на основании исследования различных признаков клещей (многие из них раньше не принимали во внимание) и на сравнительно-морфологической основе дал свою систему [24].

Видовой состав клещей нашей страны выяснили к 1931 г. с помощью ведущих иностранных ученых.

Опубликованы монографии, касаемые отдельных стран, территорий или групп иксодовых клещей: Н. Hoogstraal – клещи Саудовской Аравии, J.B. Walker et al. – обзор иксодовых клещей в Южной Африке, J.B. Walker et al. – представители рода *Rhipicephalus* мира, K.F. Teng et al. – исследования рода *Ixodes* в Китае и др. [22, 24]. Над созданием определителей иксодовых клещей всего мира работали J.-L. Camicas et al., G.V. Kolonin, A.A. Guglielmone et al. [19, 24].

Отдельно уделяли внимание идентификации видов по личиночной стадии клеща: дихотомический определитель иксодовых клещей Европы по личинкам и определители личинок клещей Ixodidae (Acari) в Калифорнии [22].

Электронные определители. Разработка методов распознавания и онлайн-систем хранения, управления и обработки таксономической информации – один из самых активно развивающихся и важных направлений в таксономии в последние годы. Они позволяют получать результаты в очень короткие сроки, дают возможность реализовывать биологические инвентаризации коллекций. Цифровые технологии создадут функциональные системы доступа и обмена информацией, поэтому они могут быть эффективно использованы для прикладных задач, обучения или чисто научных целей.

В мире разработаны онлайн-ресурсы по идентификации клещей – интерактивный определитель иксодовых клещей (Ixodidae) восточной части США [20, 21] и Нью-Джерси [25]; по клещам, имеющим ветеринарное значение в Великобритании и Ирландии – ESCCAP UK & Ireland (электронный иллюстративный каталог) [18].

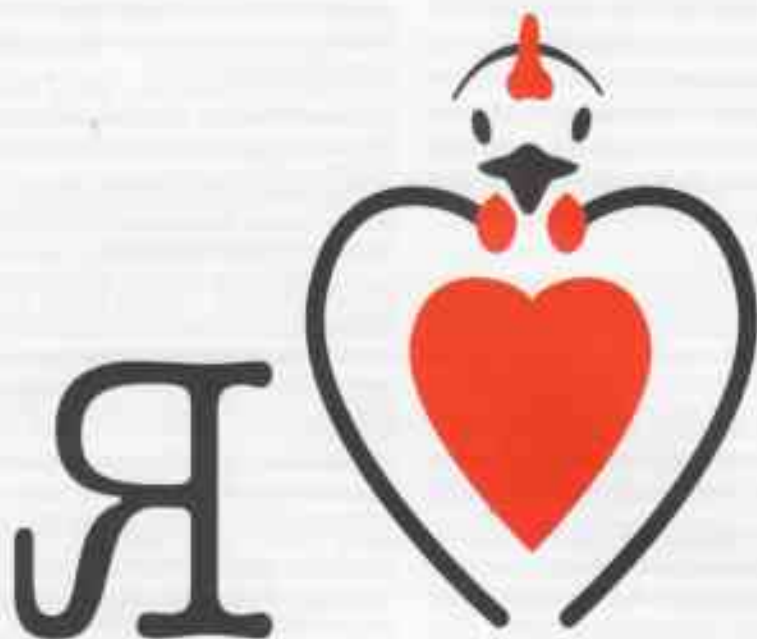
Заключение. Проведенный нами обзор мировой литературы предназначен для последующей разработки и внедре-

ния каталогов-определителей иксодовых клещей, основанных на цифровых технологиях. Данное направление работы перспективное и имеет большой научный потенциал. Объединенные в единое электронное пространство сведения будут использованы в науке и образовании, в практической работе ветеринарными врачами, станут незаменимы при проведении противоэпидемических и профилактических мероприятий, смогут быть полезны в музейной работе со сборами иксодовых клещей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Апанаскевич Д.А., Филиппова Н.А. К идентификации видов и подвидов рода *Hyalomma* (Acari: Ixodidae) фауны России и сопредельных территорий по личиночной фазе. *Паразитология*. 2007; 41(4):268 – 283.
2. Балашов Ю.С., Григорьева Л.А., Леонович С.А. Определение биологического возраста самок таежных клещей (*Ixodes persulcatus*) по изменениям формы тела и поверхности кутикулы. *Паразитология*. 2009; 43(6):433 – 436.
3. Белименко В.В., Гулюкин А.М., Махмадшоева З.А. Оптимизация информационных потоков и цифровизация системы государственного эпизоотологического мониторинга. *Ветеринария и кормление*. 2018; 7:19 – 22. DOI:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-7-8
4. Глазунов Ю.В. Состояние научно-исследовательской работы по иксодовым клещам. *Вестник Государственного аграрного университета Северного Зауралья*. 2017; 1(36):88 – 92.
5. Гулюкин Е.А. Современные методы и инновационные подходы в сфере эпизоотологического мониторинга клещевых болезней. *Ветеринария, зоотехния и биотехнология*. 2024; 8:138 – 144. DOI:10.36871/vet.zoo.bio.202408016
6. Коровкин А.М. Видовая идентификация иксодовых клещей по фотографиям с помощью нейронной сети. Информационные и математические технологии в науке и управлении. 2018; 3(11):73 – 80. DOI:10.25729/2413-0133-2018-3-08
7. Леонович С.А. О происхождении иксодовых клещей (Parasitiformes, Ixodidae). *Паразитология*. 2023; 57(2):91 – 107. DOI:10.31857/50031184723020011
8. Леонович С.А. Строение желез поровых полей (area porosa) у европейского лесного клеща *Ixodes ricinus* (L.) (Ixodidae, Ixodinae). *Паразитология*. 2014; 48(6):449 – 453.
9. Померанцев Б.И. Иксодовые клещи (Ixodidae). Фауна СССР. Паукообразные. Т. 4. Вып. 2. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1950; 225 с.
10. Федоров Д.С., Леонович С.А. Анализ находок и паразито-хозяйинные связи иксодового клеща *Ixodes trianguliceps* Birula, 1895 (Ixodidae, Ixodinae) на северо-западе России и в соседних европейских странах. *Паразитология*. 2021; 55(3):226 – 237. DOI:10.31857/50031184721030030
11. Филиппова Н.А. Особенности рангов род и подрод и интеркалярное объединение группа видов у иксодовых клещей (Acari, Ixodidae). *Паразитология*. 2008; 42(4):249 – 264.
12. Филиппова Н.А. Таксономическая внутривидовая дифференциация у иксодовых клещей (Acari: Ixodidae) с позиций морфологической концепции вида. *Паразитология*. 2007; 41(6):409 – 427.
13. Цапко Н.В. Иксодовые клещи (Acari, Ixodidae) Северного Кавказа: видовое разнообразие, паразито-хозяйинные отношения. *Паразитология*. 2017; 51(2):104 – 120.
14. Цапко Н.В. Список видов иксодовых клещей (Acari: Ixodidae) России. *Паразитология*. 2020; 54(4):341 – 352. DOI:10.31857/51234567806040069
15. Шабейкин А.А., Гулюкин А.М., Белименко В.В., Гулюкин М.И. Анализ и оценка рисков возникновения вспышек природно-очаговых зооантропонозных инфекций с использованием геоинформационных технологий. Москва: Агентство творческих технологий, 2018; 40 с. ISBN 978-5-9906389-8-3. DOI:10.30917/ATT-PRINT-2018-2
16. Belimenko V.V., Gulyukin A.M. Tick-borne diseases epidemiological monitoring system in the Russian Federation. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2020; 548:42039. DOI:10.1088/1755-1315/548/4/042039
17. Chávez Esponda D.M., Ramos L., Cabrera I.M. Study and identification of acari of Phytoseiidae family using computer applications. *Vestnik of Voronezh State Agrarian University*. 2014; 3(42):55 – 59.
18. ESCCAP UK & Ireland. URL: <https://www.esccapuk.org.uk/page/Tick-ID/48/>
19. Guglielmone A.A., Robbins R.G., Apanaskevich D.A., Petney T.N., Estrada-Peña A., Horak I.G. The hard ticks of the world: (Acari: Ixodida: Ixodidae). London: Springer, 2014; 738. <http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-7497-1>
20. Interactive Identification Key for the Hard Ticks (Ixodidae) of the Eastern U.S. URL: <https://digitalcommons.georgiasouthern.edu/usntc/key/>
21. Interactive Identification Key for the Hard Ticks (Ixodidae) of the Eastern U.S. 2023. URL: https://medical-entomology.inhs.illinois.edu/files/2023/06/INHS-MEL-2023-Instructions_IL-Common-Adult-Ticks_Matrix-ID-Key.pdf
22. Kleinjan J.E., Lane R.S. Larval keys to the genera of Ixodidae (Acari) and species of Ixodes (Latreille) ticks established in California. *Pan-Pac Entomol.* 2008; 1; 84(2):121 – 142. DOI:10.3956/2007-38.1
23. Kolonin G.V. Fauna of ixodid ticks of the world. 2009. URL: <https://web.archive.org/web/20100922170628/http://www.kolonin.org/3.html>
24. Kolonin G.V. World distribution of ixodid ticks (genera *Hyalomma*, *Aponomma*, *Amblyomma*). Moscow: Nauka, 1983; 120 p.
25. New Jersey Agricultural Experiment Station. Center for Vector Biology. Tick Identification Resources <https://vectorbio.rutgers.edu/outreach/tickID.php>

Ceva
IBird®



**ЗДОРОВЫХ
ЦЫПЛЯТ**

Севак IBird®: контроль инфекционного
бронхита кур с первого дня жизни

ООО «Сева Санте Анималь»
109428, г. Москва, Рязанский пр-т, д. 16
Тел. (495) 729-59-90, факс (495) 729-59-93



ПЕРЕД ПРИМЕНЕНИЕМ ОЗНАКОМЬТЕСЬ С ИНСТРУКЦИЕЙ

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ У МЫШЕЙ

Федор Иванович Василевич, д.в.н., профессор, академик РАН

Валентина Михайловна Бачинская, д.б.н., доцент, bachinskaya1980@mail.ru

ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной
медицины и биотехнологии – МВА имени К. И. Скрябина»

Наталья Романовна Шарапова, руководитель проектов по животноводству, Tatunia2004@list.ru

Виталия Игоревна Гурьева, специалист по животноводству

Центр инноваций ОПАО «Апатит»

В статье представлены результаты исследования на белых мышах кормовой добавки Энзимспорин как средства профилактики кишечных инфекций. Самцы белых мышей (SHK) с питьевой водой получали пробиотическую кормовую добавку в дозе 0,2 г/гол/сут (1×10^9 КОЕ/гол/сут). На 22-й день опыта животным внутрибрюшинно вводили суспензии суточных культур *Escherichia coli* 1618-VIEV; *Listeria monocytogenes* B-1421; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 и *Salmonella typhimurium* 1808-VIEV. Энзимспорин в применяемой дозе повысил выживаемость мышей, зараженных культурами патогенных микроорганизмов, снизил воспаление и повреждения кишечника, способствовал уменьшению выраженности клинических признаков. Полученные результаты свидетельствуют, что исследуемую кормовую добавку можно рассматривать как профилактический препарат в случае кишечных бактериальных инфекций, а также как вспомогательное средство при комплексной терапии для поддержания здоровья и полезной микрофлоры кишечника. **Ключевые слова:** пробиотики, кормовые добавки, кишечные инфекции, микробиом кишечника, Энзимспорин.

The effectiveness of probiotic feed additives for the prevention of intestinal infections in mice

F.I. Vasilevich, PhD in Veterinary Sciences, Professor, Academician the RAS

V.M. Bachinskaya, PhD in Biology, Assistant professor, bachinskaya1980@mail.ru

Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology –
MVA named after K.I. Scriabin

N.R. Sharapova, Head of livestock projects, Tatunia2004@list.ru

V.I. Guryeva, Animal husbandry specialist
Innovation Center of JSC Apatit

This article presents the results of a study of the effect of the feed additive Enzimsporin on white mice. For this purpose, male white mice (SHK) were given the probiotic feed additive with drinking water at a dosage of 0,2 g/head/day (1×10^9 CFU/head/day). On the 22nd day, the mice were intraperitoneally injected with suspensions of daily cultures of microorganisms: *Escherichia coli* 1618-VIEV; *Listeria monocytogenes* B-1421; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; *Salmonella typhimurium* 1808-VIEV. The use of Enzimsporin contributed to an increase in the survival rate of mice infected with cultures of pathogenic microorganisms, a decrease in inflammation and intestinal damage, and an amelioration of clinical signs. The obtained results indicate that the studied probiotic feed additive can be considered as a preventive measure in the treatment of intestinal infections of bacterial origin, as well as an auxiliary means for maintaining health and beneficial intestinal microflora as part of complex therapy. **Key words:** probiotics, feed additives, intestinal infections, intestinal microbiome, Enzimsporin.

DOI:10.30896/0042-4846.2025.28.6.45-50

Пробиотики, содержащие в своем составе живые микроорганизмы, играют ключевую роль в поддержании баланса кишечной микрофлоры [3]. Множество исследований в этой области доказали их эффективность в подавлении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) животных [5]. Механизм действия пробиотиков, помимо колонизации кишечника, заключается в изменении микробиома,

выработке бактериоцинов и стимуляции роста полезной микрофлоры. Ключевым преимуществом следует считать иммуномодулирующий эффект, укрепляющий защитные функции организма [1, 2, 4].

Особо следует выделить пробиотические штаммы рода *Bacillus*, проявляющие высокую антагонистическую активность в отношении широкого спектра патогенных бактерий, в том числе эшерихий, сальмонелл, шигелл, стрептококков, энте-

рококков и других, не подавляя при этом рост полезных лакто- и бифидобактерий [10]. Данное свойство делает их перспективными при совместном применении с антибиотиками, особенно для профилактики и лечения функциональных и инфекционных нарушений желудочно-кишечного тракта. Длительное использование пробиотиков, в отличие от антибиотиков, обычно не сопровождается побочными эффектами [2]. Пробиотики – это живые микроорганизмы, которые при введении в достаточном количестве оказывают благотворное влияние на здоровье организма-хозяина, согласно действующему определению Международной научной ассоциации пробиотиков и пребиотиков (ISAPP), Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций (ФАО) и Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) [6 – 8].

Цель исследований – установить эффективность пробиотической кормовой добавки Энзимспорин для профилактики кишечных заболеваний, возбудителями которых являются *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*

Материалы и методы. Для выполнения работы в биопитомнике «Стезар» приобрели самцов белых мышей SHK массой тела от 13 до 20 г. Животных содержали в клетках из полипропилена 530×325×200 CL-1335, кормили комбикормом (ООО «Кормовитум»), изготовленным в соответствии с ГОСТ 34566–2019 «Комбикорма полнорационные для лабораторных животных» (ОР), использовали чистую питьевую воду.

Опыт провели на десяти группах самцов белых мышей по 20 голов в каждой на протяжении 45 суток. Животные первой группы (положительный контроль) получали только основной рацион (ОР); второй – ОР + ежедневно вместе с водой им выпаивали пробиотическую кормовую добавку Энзимспорин в дозе 0,2 г/гол/день (1×10^9 КОЕ/гол/день); третьей, четвертой, пятой и шестой группы (отрицательный контроль) – ОР + на 22-й день опыта их внутрибрюшин-

но заражали суточными культурами соответственно *Escherichia coli* 1618-VIEV; *Listeria monocytogenes* B-1421; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 и *Salmonella typhimurium* 1808-VIEV. Мыши седьмой, восьмой, девятой и десятой группы (опытные) получали ОР + ежедневно им выпаивали Энзимспорин в дозе 0,2 г/гол/день (1×10^9 КОЕ/гол/день) + на 22-й день им внутрибрюшинно вводили суточные культуры *Escherichia coli* 1618-VIEV; *Listeria monocytogenes* B-1421; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 и *Salmonella typhimurium* 1808-VIEV соответственно.

Патогенность микроорганизмов определяли биологической пробой. Штаммы *Salmonella typhimurium* 1808-VIEV и *Listeria monocytogenes* B-1421 являются патогенными для мышей даже в минимальных концентрациях – 3×10^8 клеток/мл и 6×10^8 клеток/мл. *Escherichia coli* 1618-VIEV – слабопатогенный для лабораторных мышей, а патогенность штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 не установили.

На 6- и 10-й день после заражения оценивали степень поражения кишечника. Для этого по пять животных из каждой группы подвергали эвтаназии, проводили патологоанатомическое вскрытие с последующими патогистологическим и морфометрическим исследованием. Органы фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, обрабатывали патологический материал по Л.А. Меркулову и Р. Лилли (1969). На микротоме MPS-2 изготовили гистологические срезы толщиной 5 – 7 мкм и красили их гематоксилином и эозином. Перед окрашиванием срезы очищали от парафина ксилолом. Образцы слизистой изучали с помощью биологического микроскопа ScienOpBP-52 с увеличением 7х, 10х окуляров и 4х, 10х линз. Фотографии делали цифровой камерой и окуляром для микроскопа DCM800 (8000 пикселей, USB2.0).

Результаты исследований. Пробиотическая кормовая добавка Энзимспорин в дозе 0,2 г/гол/день повышала сохранность белых мышей после внутрибрюшинного введения им суточной культуры *E. coli* и *Staphylococcus aureus* до 80 %

в седьмой и девятой группах (против 75 и 80 % у мышей из групп отрицательно-го контроля – третьей и пятой). При инокуляции суспензии из культуры *Listeria monocytogenes* сохранность составила 20 % (35 % в контроле), а при введении *Salmonella typhimurium* в опытной группе выжило одно животное (сохранность 5 %), тогда как в контрольной группе (без пробиотика) погибли все мыши.

На 35-е сутки эксперимента при клиническом осмотре у мышей пятой и девятой групп, зараженных *Staphylococcus aureus*, отметили пиодермию (гнойные поражения кожи) и подкожной жировой клетчатки, но в девятой группе с Энзимспорином поражено было 33 % животных, а у отрицательного контроля (пятая группа) – 77 % мышей.

Гистологические и морфологические исследования выявили, что в опытных группах, где мышей заражали патогенами на фоне применения пробиотической кормовой добавки, в большей мере сохранялась целостность слизистой оболочки кишечника, в тканях активировались иммунные клетки, улучшились морфометрические показатели толстого отдела кишечника по сравнению с контрольными группами, в которых мышей только заражали. На рисунках представлена гистокартинка кишечника мышей разных групп, влияние на нее патогенов и пробиотической добавки, ее действие на интактных и зараженных животных. На всех фото окраска гематоксилином и эозином, увеличение – 100х.

У мышей первой группы (положительный контроль), которым не добавляли пробиотик и не вводили патогены, изме-

нений в структуре мышечного, подслизистого и слизистого слоев тонкого отдела кишечника не выявили (рис. 1).

Добавка пробиотика не повлияла на мышечный слой и подслизистую основу тонкой кишки – они были компактные и равномерные. Но в гистоархитектонике слизистой видны гиперфункция бокаловидных клеток, клеток Панета и диффузная инфильтрация лимфоидными клетками, что указывает на выраженную иммуностимулирующую активность пробиотической добавки (рис. 2).

Клетки Панета – клетки тонкой кишки, обеспечивающие антибактериальную защиту. Они названы в честь австрийского врача Йозефа Панета. Функционально схожи с нейтрофилами, при столкновении с бактериями или бактериальными антигенами выделяют антимикробные вещества в просвет крипты, способствуя поддержанию кишечного барьера.

В подслизистом слое тонкого кишечника особой третьей группы, зараженных *E. coli* 1618-VIEV, в большом количестве обнаружили диффузно расположенные лейкоциты. Выражена функция клеток Панета в фундальной части крипт. Апикальная часть ворсинок частично десквамирована. В просвете кишки наблюдали отслаивание эпителия, белковый компонент с примесью бактериальной массы и фрагменты корма растительного происхождения. Гистологическая картина слизистой демонстрирует ее нарушение с выраженным воспалительным процессом (рис. 3).

Иначе выглядела гистология тонкого отдела кишечника при использовании пробио-

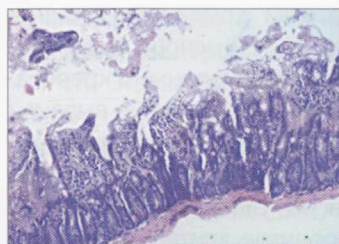


Рис. 1. Ворсинки тонкого отдела кишечника здоровых мышей

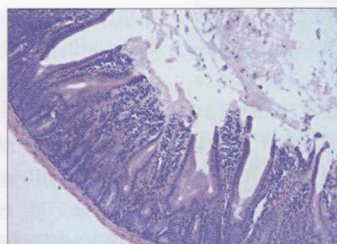


Рис. 2. Ворсинки тонкого отдела кишечника мышей, получавших Энзимспорин без заражения (вторая группа)

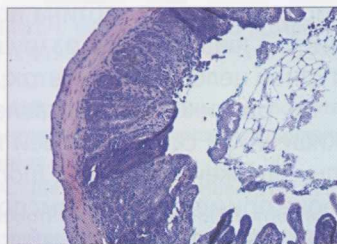


Рис. 3. Ворсинки тонкого отдела кишечника мышей третьей группы (отрицательный контроль *E. coli*)

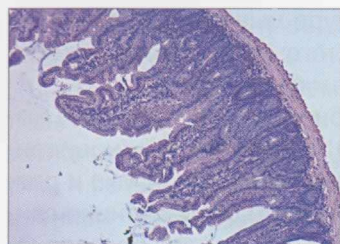


Рис. 4. Ворсинки тонкого отдела кишечника мышей седьмой группы (Энзимспорин + заражение *E. coli*)

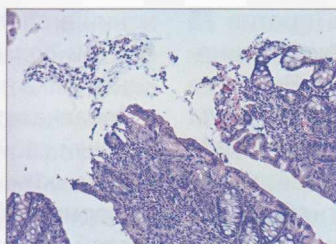


Рис. 5. Разрушенные апикальные части ворсин тонкого отдела кишечника мышей четвертой группы (отрицательный контроль *Listeria monocytogenes*)



Рис. 6. Ворсинки тонкого отдела кишечника мышей восьмой группы (Энзимспорин + заражение *Listeria monocytogenes*)

тика (рис. 4). Мышечный слой компактный, равномерный. В подслизистом слое в большом количестве диффузно расположены лейкоциты. Выражена функция клеток Панета в фундальной части крипт. В собственной пластине слизистой оболочки также находилось большое количество лейкоцитов, но клетки кишечника меньше разрушены. Слизистая оболочка кишки активно инфильтрирована лимфоидными клетками, в просвете выявлены редкие базофильно окрашенные бактериальные массы. Отмечена выраженная иммунная реакция.

На рисунке 5 – гистокартинка стенки кишки мышей четвертой группы, получивших *Listeria monocytogenes* B-1421. Слизистая оболочка кишки инфильтрирована лимфоидными клетками. Апикальная часть ворсин разрушена, эпителий слущен в просвет кишки, визуализируется аморфный секрет бокаловидных клеток. В просвете кишки отмечено большое количество палочковидной, базофильной бактериальной массы, некоторые – с десквамированными клетками эпителия слизистой оболочки и бактериальной массой. Явная гистологическая картина поражения слизистой кишечника с разрушением структурной целостности клеток.

На рисунке 6 представлена слизистая кишечника самцов мышей восьмой группы, зараженных *Listeria monocytogenes* на фоне применения Энзимспорина. Мышечный слой равномерный, подслизистый без особенностей, в подслизистой оболочке видна значительная инфильтрация лимфоидными клетками. В апикальной ча-

сти ворсин регистрировали отторжение эпителия слизистой оболочки, десквамация его в просвет. В фундальном отделе крипт выявили скопления ацидофильных гранул. Гистологическая картина воспалительного процесса – частичное разрушение клеток слизистого слоя.

Исследования ткани слизистой оболочки кишечника мышей после введения им суспензии *Staphylococcus aureus* показали, что мышечный слой и подслизистая основа оставались компактными, слизистая оболочка кишки была активно инфильтрирована лимфоидными клетками (рис. 7). В фундальной части крипт слизистой выявили многочисленные скопления ацидофильных гранул. В просвете кишки локализовался клеточный десквамат апикальной части ворсин и базофильная бактериальная масса. Налицо – гистологическая картина разрушения клеток кишечника и выраженной воспалительной реакции.

На рисунке 8 изображена стенка тонкой кишки самца, который получал пробиотик, и на этом фоне ему ввели суспензию *Staphylococcus aureus*. Мышечный слой и подслизистая основа компактные, равномерные. В подслизистой основе выражены кровеносные сосуды с умеренным кровенаполнением. В слизистой оболочке выявили умеренное количество функционирующих бокаловидных клеток. Местами в апикальной части ворсин отмечали небольшие скопления эритроцитов, эпителий – единично слущен в просвет кишечника. Характерная картина разрушения клеток кишечника и выраженной воспалительной реакции.

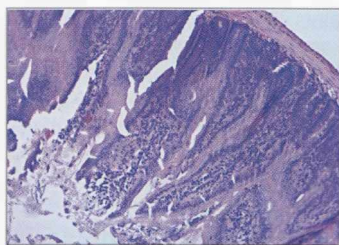


Рис. 7. Тонкий отдел кишечника мышей шестой группы (отрицательный контроль *Staphylococcus aureus*)

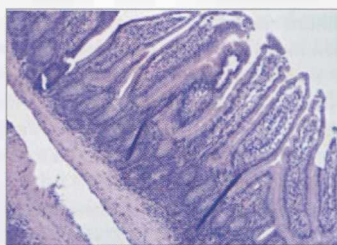


Рис. 8. Тонкий отдел кишечника мышей девятой группы (Энзимспорин + *Staphylococcus aureus*)

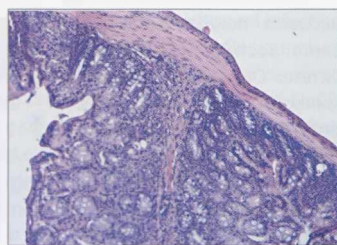


Рис. 9. Толстый отдел кишечника мышей шестой группы (отрицательный контроль *Salmonella typhimurium*)

Внутрибрюшинная инокуляция intact-самцам *Salmonella typhimurium* привела к нарушению слизистой оболочки толстого отдела кишечника (рис. 9). Мышечный слой равномерный, слизистая оболочка представлена умеренным количеством функционирующих бокаловидных клеток. В просвете кишки множество палочковидной, базофильной бактериальной массы.

Гистологическая картина слизистой кишечника мышей десятой группы, которых заражали *Salmonella typhimurium* на фоне применения пробиотика: мышечный слой компактный, равномерный. Подслизистый слой и собственная пластинка слизистой оболочки диффузно инфильтрированы клетками лимфоидного ряда. В толще слизистой выражена гиперемия кровеносных сосудов. Наблюдается десквамация эпителия ворсин. В просвете кишки некое содержимое, состоящее из энтероцитов, большей частью некротических и бактериальных масс. Клетки кишечника меньше разрушены под действием патогенной флоры. Отмечена выраженная иммунная реакция (рис. 10).

Таким образом, по результатам гистологических исследований кишечника видно, что Энзимспорин в опытных группах с *L. monocytogenes* и *E. coli* способствовал гиперфункции клеток Панета, бокаловидных клеток, а также скоплению нейтрофилов в подслизистом слое, что характерно для защитной реакции организма на внедрение патогенных микроорганизмов. Выраженных изменений со стороны всех слоев кишечника для этих патогенов не

отмечали. В опытной группе Энзимспорин с *Staph. aureus* наблюдали гиперфункцию и разрушение бокаловидных клеток, интенсивную гиперемию лимфоидными клетками, что также свидетельствует об активном иммунном ответе со стороны тканей кишечника.

Заключение. Пробиотическая кормовая добавка Энзимспорин эффективна в качестве профилактического и терапевтического средства при кишечных заболеваниях бактериальной этиологии. Она способна сгладить клинические проявления бактериальных заболеваний, повысить иммунный статус и поддержать нормальную микрофлору кишечника.

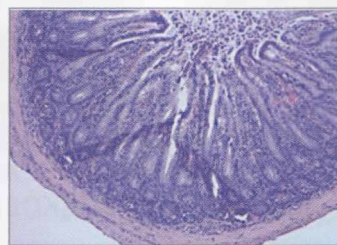


Рис. 10. Ворсинки тонкого отдела кишечника мышей десятой группы (Энзимспорин + *Salmonella typhimurium*)

ЛИТЕРАТУРА

1. Афанасьева Ю.Г., Корбмахер Е.Р., Колодина Е.В. и др. Пробиотики – альтернатива кормовым антибиотикам. Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2023; 2(220):65 – 72. DOI 10.53083/1996-4277-2023-220-2-65-72. EDN LSNIOO.
2. Данилевская Н.В. Фармакологические аспекты применения пробиотиков в ветеринарии. Ветеринария сельскохозяйственных животных. 2011; 10:8 – 14.
3. Лебедева И.А., Щепеткина С.В., Новикова М.В., Сканчев А.И. Пробиотики в современном птицеводстве. БИО. 2018; 1(208):32 – 37. EDN OZCSXR.
4. Некрасов Р.В., Чабанов М.Г. и др. Пробиотик нового поколения в кормлении коров. Достижения науки и техники АПК. 2013; 3:38 – 40. URL: <https://inlink.ru/MjRX37> (дата обращения: 08.05.2023).

5. Смоленцев С.Ю. Влияние пробиотиков на ростовые показатели молодняка крупного рогатого скота. Вестник Марийского государственного университета. Серия «Сельскохозяйственные науки. Экономические науки». 2023; 9(2):197 – 204. DOI: <https://doi.org/10.30914/2411-9687-2023-9-2-197-204>

6. FAO/WHO "Guidelines for the evaluation of probiotics in food," Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Ontario, Canada, 2002.

7. FAO/WHO, "Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria," 2001. <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>.

8. Foley S.L., Johnson T.J., Ricke S.C., Nayak R., Danzeisen J. Salmonella Pathogenicity and

Host Adaptation in Chicken-Associated Serovars. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2013; 77:582 – 607. DOI:10.1128/mmbr.00015-13

9. Galyautdinova G.G., Egorov V.I., Saifutdinov A.M. et al. Detection of tetracycline antibiotics in honey using high-performance liquid chromatography. International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences. 2020; 11(1):311 – 314. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=43224149> (дата обращения: 06.05.2023).

10. Hatamov A.H., Salimov X.S. Parrandalar salmonellyozining laboratoriya tashhisi. Veterinariya va chorvachilikni rivojlantirish istiqbollari: zamonaviy amaliyot va innovasion texnologiyalar. Respublika ilmiy-amaliy konferensiya materiallar to'plami, Samarqand, 2020; 12 – 124.

УДК 619:591.111.7:636.5.034:615.33

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭРИТРОЦИТОВ УТЯТ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЦИПРОФЛОКСАЦИНА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СТАФИЛОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ И ОСМОТИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ

Андрей Андреевич Присный, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник Белгородского филиала
Владимир Николаевич Скворцов, д.в.н., руководитель Белгородского филиала

Татьяна Валерьевна Степанова, старший научный сотрудник

ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН» (г. Москва, Россия)

Елена Александровна Гребцова, к.б.н., доцент

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ») (г. Белгород, Россия)

Изучили влияние осмотической нагрузки на морфометрические показатели эритроцитов утят под действием ципрофлоксацина в условиях экспериментальной инфекции, вызванной *Staphylococcus aureus*. Опыт провели на трех группах утят башкирской породы в возрасте 21 суток. Птица первой группы – контроль, утят второй и третьей группы внутрибрюшинно заражали культурой *Staphylococcus aureus* в концентрации 5 McF, при этом молодняку третьей группы за сутки до заражения начали выпаивать ципрофлоксацин в дозе 200 мг/л, курсом – 5 дней. Через один, три, шесть, девять и тринадцать дней после заражения у утят всех групп брали кровь, стабилизировали ее гепарином. Устойчивость эритроцитов к среде с пониженной осмолярностью оценивали, инкубируя 30 секунд цельную кровь с изотоническим раствором (0,93 % NaCl) и также с гипотоническим раствором (0,33 % NaCl) в соотношении 1:1. Готовили три группы мазков (из цельной крови, суспензии с изотоническим и гипотоническим раствором), окрашивали их по Романовскому-Гимзе. В мазках определяли морфометрические параметры эритроцитов. Изменение площадей клеток и ядер под влиянием осмотической нагрузки привело к колебаниям ядерно-цитоплазматического отношения в эритроцитах утят первой и второй групп. В эритроцитах птицы третьей группы отмечали синхронность реакции клетки и ядра, что связано с действием ципрофлоксацина. **Ключевые слова:** утята, кровь, эритроциты, стафилококк, ципрофлоксацин.

Morphometric parameters of ducklings' erythrocytes under the influence of ciprofloxacin in conditions of experimental staphylococcal infection and osmotic load

A.A. Prisnyi, PhD in Biology, Professor, Chief researcher

V.N. Skvortsov, PhD in Veterinary Science, Head of the branch

T.V. Stepanova, Senior researcher

All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Scriabin and Ya.R. Kovalenko RAS

E.A. Grebtsova, PhD in Biology, Associate professor

Belgorod National Research University

The effect of osmotic pressure on the morphometric parameters of ducklings' erythrocytes under the influence of ciprofloxacin in conditions of experimental staphylococcal infection caused by *Staphylococcus aureus* culture was studied. Ciprofloxacin is widely used in poultry farming due to its excellent pharmacodynamic and antimicrobial properties. The study involved three groups consisting of Bashkir ducklings aged 21 days. Group III were treated with

ciprofloxacin at a dosage of 200 mg/l for five days. A day after the start of antibiotic treatment, intraperitoneal infection of groups II and III with *Staphylococcus aureus* culture at a concentration of 5McF was carried out. Intracardiac puncture blood sampling was performed on the 1st, 3rd, 6th, 9th, and 13th days after infection. To assess the resistance of red blood cells to an environment with reduced osmolarity, whole blood was incubated in an isotonic solution (0,93 % NaCl), in a hypotonic solution (0,33 % NaCl), in a ratio of 1:1 for 30 seconds. The sizes of the long and short axes of cells and their nuclei were estimated in blood smears. The surface area and volume of red blood cells were determined. The smallest changes in morphometric parameters in the hypotonic environment were demonstrated by the erythrocytes of birds of the experimental groups. This could be due to the initial increase in cell size under the influence of *Staph. aureus* alpha toxin, so the further increase in surface area and volume was not as dramatic as in the case of intact bird erythrocytes. Changes in the areas of cells and nuclei under the influence of osmotic load led to fluctuations in the nuclear-cytoplasmic ratio in the control group and group II. In group III erythrocytes exposed to the antibiotic, the synchronicity of the cell and nucleus reactions was noted. **Key words:** ducklings, blood, red blood cells, *Staphylococcus*, ciprofloxacin.

DOI:10.30896/0042-4846.2025.28.6.50-54

В настоящее время в птицеводстве широко используют фторхинолоновые антимикробные препараты для профилактики и лечения инфекционных заболеваний. Это связано с их высокой эффективностью, широким спектром действия против грамположительных и грамотрицательных бактерий и хорошей переносимостью. Ранее мы изучили влияние препаратов этой группы на лейкограмму крови цыплят и отметили лимфопению под воздействием энрофлоксацина, норфлоксацина и моксифлоксацина, базофилию при выпаивании птице левофлоксацина, энрофлоксацина и офлоксацина. Только цiproфлоксацин не вызывал значительных изменений в лейкоцитарной формуле [2]. В работе S. Kashif et al., посвященной изучению влияния цiproфлоксацина на эритроциты человека, отмечено, что 48-часовое инкубирование эритроцитов в растворе Рингера с добавлением препарата может приводить к повышению объема клеток на 11 % [8]. Существуют противоречивые сведения о влиянии антимикробных препаратов на функциональные особенности клеток крови. Несмотря на то что была продемонстрирована взаимосвязь между фторхинолонами и окислительным стрессом [3, 7, 10], их влияние на хрупкость эритроцитов птиц изучено недостаточно.

Цель данной работы – исследовать влияние цiproфлоксацина на морфо-

метрические показатели эритроцитов, а также оценить их реакцию на действие гипотонической среды в условиях экспериментально вызванного стафилококкоза.

Материалы и методы. Для проведения исследования сформировали три группы утят башкирской породы в возрасте 21 суток. Первая группа – контрольная, вторая и третья – опытные. Молодняку третьей группы в течение пяти суток выпаивали цiproфлоксацин в дозе 200 мг/л. Через сутки после начала выпаивания птицу второй и третьей группы внутрибрюшинно заражали культурой *Staphylococcus aureus* в концентрации 5McF. На первые, третьи, шестые, девятые и тринадцатые сутки после инфицирования у утят всех групп методом внутрисердечной пункции брали кровь и стабилизировали ее гепарином.

Для оценки устойчивости эритроцитов к среде с пониженной осмоларностью смешивали цельную кровь с изотоническим раствором (0,93 % NaCl) в соотношении 1:1, с гипотоническим раствором (0,33 % NaCl) в соотношении 1:1 и инкубировали 30 секунд. Готовили три группы мазков: из цельной крови, суспензии с изотоническим и гипотоническим растворами после инкубирования. В мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимзе, измеряли длинную и короткую ось клеток и их ядер, определяли объем

эритроцитов и площадь поверхности по формулам [1]:

$$\varepsilon = \sqrt{1 - \left(\frac{b}{a}\right)^2},$$

где ε – коэффициент эксцентricности эритроцита, a – величина длинной полуоси эритроцита, b – таковая короткой полуоси;

$$V = \frac{4}{3}\pi ab^2,$$

где V – объем эритроцита (μm^3);

$$S = 2\pi b\left(b + \frac{a}{\varepsilon} \arcsin \varepsilon\right).$$

где S – площадь поверхности эритроцита (μm^2).

Контролировали динамику ядерно-цитоплазматического отношения (ЯЦО) эритроцитов экспериментальных групп под воздействием среды с пониженной осмолярностью. ЯЦО рассчитывали по формуле:

$$\text{ЯЦО} = \frac{S_{\text{я}}}{S_{\text{ц}}},$$

где $S_{\text{я}}$ – площадь ядра, $S_{\text{ц}}$ – площадь цитоплазмы.

Статистическая обработка данных включала расчет среднего значения (M) и стандартной ошибки среднего (m) с помощью программы Microsoft Excel, значимость различий оценивали непараметрическим U -критерием Манна-Уитни.

Результаты исследований. Проанализировали внутригрупповые отличия площади поверхности и объема эритроцитов, разброс не превышал 10 % в течение всего периода наблюдения. Поэтому отличия значений до 10 % внутри первой и третьей групп не связывали с экспериментальным воздействием инфекции или антибактериального препарата.

С первого по девятый день наблюдения площадь поверхности эритроцитов

опытных (второй и третьей) групп имела статистически значимые отличия по сравнению с показателем в контроле. Однако в первой и третьей группе регистрировали одинаковую динамику морфометрических показателей: вслед за увеличением площади поверхности клеток на третий день после отмены препарата следовало уменьшение данного параметра на шестые сутки. Далее вновь наблюдали увеличение площади с последующим возвращением к исходному значению контрольной группы. Подобных перепадов показателя во второй группе не зафиксировали – наблюдали постепенное уменьшение площади поверхности почти до контрольных значений. На тринадцатые сутки площадь поверхности эритроцитов во всех группах была идентичной.

Объем эритроцитов утят второй и третьей группы достоверно отличался от такового в первой в каждой контрольной точке (рис. 1). В первые сутки этот показатель превышал контрольное значение соответственно на 24,8 и 29,9 %, на третьи – на 11,4 и 14,8 %, на шестые – на 32,7 и 18,2 %. Однако, на девятые сутки объем эритроцитов птицы второй группы был меньше контрольного на 5 %, а третьей – наоборот, превысил объем контрольных на 20,8 %. В заключительный день этот параметр во второй группе был равен контрольному, а в третьей – был на 6 % ниже.

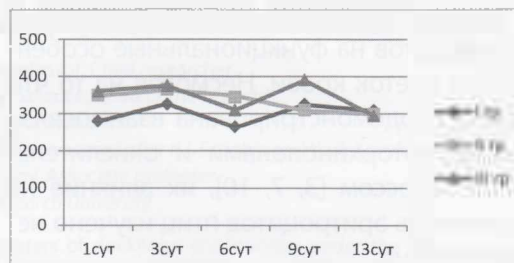


Рис. 1. Объем эритроцитов в аутологичной плазме в течение тринадцати суток, μm^3

Выявленное увеличение объема эритроцитов у зараженных утят может быть связано с действием альфа-гемолизина, выделяемого бактериальными клетками. Это привело к образованию пор в мембране эритроцитов и способствовало поступлению воды внутрь [4]. Однако, случаев гемолиза не фиксировали. Существуют данные, что фторхинолоны могут влиять на устойчивость клеток к гемолизу. N. Chatterjee [5] отмечал, что инкубирование эритроцитов кроликов с ципрофлоксацином, офлоксацином и норфлоксацином приводит к повышению устойчивости к гемолизу, вызванному дапсоном. Поскольку эти препараты проявляют «консервирующее» действие, их рекомендуют использовать для хранения крови.

Изотоническая среда изменила площадь поверхности и объем клеток в среднем на 9,4 % для всех изучаемых групп, что согласуется с выводами K.P. Malarkodi et al. [9]. Авторы считают, что в первые 90 минут инкубирования в синтетической изотонической среде эритроциты утки, прежде чем стабилизироваться на новом более низком уровне устойчивого состояния, претерпевают изменения, связанные с транспортом ионов и воды через мембрану [9].

Морфометрические параметры эритроцитов птиц всех групп после пребывания в гипотонических условиях увеличились по отношению к размерам клеток в аутологичной

плазме (рис. 2). У утят контрольной группы в первый день наблюдений площадь поверхности эритроцитов и их объем выросли соответственно на 24,5 и 39 %, а у птицы, зараженной *Staph. aureus*, – на 16,2 и 25,7 %. Однако, на третьи сутки размеры клеток аутологичной плазмы и инкубированных в среде с пониженной осмолярностью эритроцитов были одинаковыми. Эритроциты утят третьей группы также были большей площади и объема соответственно на 15 и 24,7 %. Только на девятые сутки морфометрические параметры клеток вернулись к исходным размерам. В течение всего исследования статистически значимой межгрупповой разницы между объемом ядер эритроцитов не фиксировали. Изменения наблюдали внутри групп. У утят контрольной группы объем ядер эритроцитов увеличился на третий и девятый день на 32 и 58 % соответственно, а у молодняка второй – на шестой и девятый день эритроциты и ядра увеличились в объеме в среднем на 30 %.

У эритроцитов птицы третьей группы действие гипотонического раствора проявилось только на тринадцатый

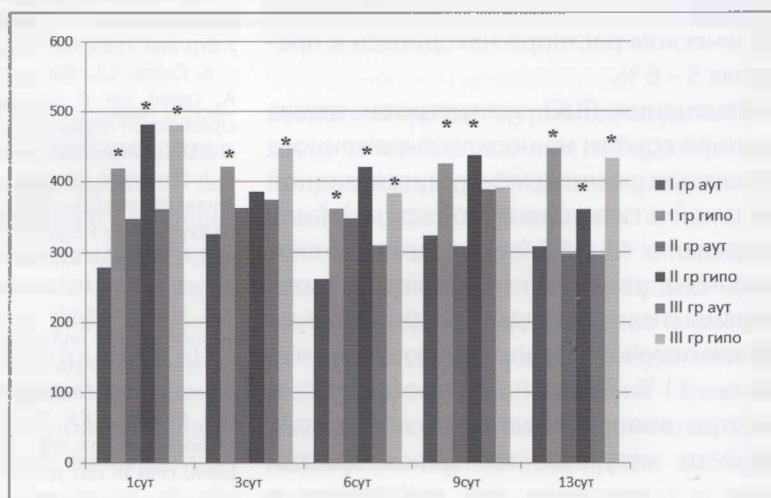


Рис. 2. Объем эритроцитов после воздействия гипотонического раствора гр. аут – эритроциты в аутологичной плазме; гр. гипо – эритроциты в гипотонической среде; * – статистически значимые отличия между клетками в аутологичной плазме и в гипотоническом растворе по U-критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$.

день – их объем повысился на 39 %. Из-за высокой проницаемости мембраны эритроцитов для этой группы антимикробных препаратов ципрофлоксацин очень быстро проникает в цитоплазму и ядро [6].

ЯЦО эритроцитов утят второй и третьей группы было достоверно ниже, чем контрольных, на 5 – 10 %, наибольшую разницу отмечали на 13-е сутки. Инкубирование в гипотонической среде снизило ЯЦО в эритроцитах контрольной группы в первые сутки на 15 %, на шестые – на 22,7 %, на 13-е – на 8,7 % за счет значительного увеличения площади поверхности клеток. На третий и девятый день, напротив, ЯЦО было выше на 15 и 23,8 % соответственно, поскольку на понижение осмолярности среды реагировала не только наружная плазматическая мембрана, но и кариолема.

У эритроцитов птицы второй группы на шестые и тринадцатые сутки зафиксировали увеличение ЯЦО соответственно на 15,8 и 21,1 % за счет существенно большей площади ядра. В остальные дни наблюдений разница между параметрами клеток в аутологичной плазме и гипотоническом растворе находилась в пределах 5 – 6 %.

Изменения ЯЦО эритроцитов птицы третьей группы не носило выраженного характера, разница между аутологичной плазмой и гипотонической средой была в пределах 4,5 – 5,5 %. Это связано с синхронным увеличением площади цитоплазмы и площади ядра. Наибольшие отличия отмечены лишь в заключительный день – 11 %. Вероятно, ципрофлоксацин быстро вызвал изменения химических свойств наружной мембраны эритроцита и кариолеммы, что выразилось в одинаковом реагировании на гипотоническую среду.

Заключение. Установили, что в условиях экспериментальной стафилокок-

ковой инфекции на фоне применения ципрофлоксацина и без него достоверно меняются некоторые морфометрические показатели эритроцитов. Изменение площадей клеток и ядер под влиянием осмотической нагрузки привело к колебаниям ядерно-цитоплазматического отношения в эритроцитах утят первой и второй групп. В клетках крови птицы третьей группы отмечали синхронность реакции клетки и ядра, что связано с действием ципрофлоксацина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Липунова Е.А., Никитин В.М., Скоркина М.Ю. Патент С1 2350952 Российская Федерация, МПК G01N 33/48. Способ определения реактивности эритроцитов крови. Заявитель и патентообладатель – Белгородский гос. ун-т. №2007124991/15, заявл. 03.09.2007. Опубликовано 27.03.2009; 1 – 12.
2. Присный А.А., Моисеева А.А., Скворцов В.Н. Сравнительный анализ влияния фторхинолонов на лейкограмму крови цыплят. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*. 2020; 2:11 – 24.
3. Aslam H.M., Sohail A., Shahid A., Khan M.A.B. et al. Levofloxacin induces erythrocyte contraction leading to red cell death. *Drug Target. Insights*. 2024; 18:78. <https://DOI.org/10.33393/dti.2024.3060>
4. Berube B., Wardenburg J. Staphylococcus aureus alpha-Toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins*. 2013; 5:1140 – 1166. DOI:10.3390/toxins5061140
5. Chatterjee N., Mehta V.L., Tayal G. Protective effect of fluoroquinolones on dapsone induced erythrolysis. *Indian J. Exp. Biol.* 1995; 33(11):883 – 885.
6. Colino C.I., Garcia Turiño A., Sanchez A., Navarro A., Lanao J.M. A comparative study of ofloxacin and ciprofloxacin erythrocyte distribution. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*. 1998; 19(2):71 – 77.
7. Donmez F., Dogan A. Investigation of the Effects of Three Different Generations of Fluoroquinolone Derivatives on Erythrocyte Fragility and Hematological Parameters in Rats. *Van Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2023; 16(3):237 – 243. <https://DOI.org/10.52976/vansaglik.1330882>
8. Kashif S., Kashif J., Mohanad Z., Al-Farga A. et al. Triggering of erythrocyte membrane blebbing by ciprofloxacin. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*. 2019; 76(5):110772.
9. Malarkodi K.P., Siva Prasad R., Varalakshmi P. Effect of lipoic acid on the oxidoreductive status of the red blood cells in rats subject to oxidative stress by chronic administration of Adriamycin. *Human and Experimental Toxicology*. 2004; 23:129 – 135.
10. Luqman S., Prabu K.O., Pal A., Saikia D. et al. Antibiotic-induced alterations in the osmotic resistance of erythrocytes is modulated by β -carotene and L-ascorbic acid. *Natural Product Communications*. 2006; 1(6):481 – 486.

СОБЛЮДЕНИЕ ТРЕБОВАНИЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ В ВЕТЕРИНАРНЫХ ИСПЫТАТЕЛЬНЫХ ЛАБОРАТОРИЯХ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ РАБОТ С ПБА II – IV ГРУПП

Евгений Александрович Тюрин, к.м.н., ведущий научный сотрудник
ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
Роспотребнадзора (г.о. Серпухов, п. Оболенск, Россия), info@obolensk.org

В статье описаны особенности организации работы в испытательных ветеринарных лабораториях (ИВЛ) с инфекционными микроорганизмами II – IV групп патогенности, опасными для человека и животных. Проанализированы требования и соблюдение положений биологической безопасности, определены факторы, влияющие на безопасное выполнение работ и меры по снижению рисков. При обследовании ряда ИВЛ выявили некоторые недоработки в организации их деятельности, которые оказались общими для многих. Они касались организационных вопросов и технического оснащения и эксплуатации оборудования, часть была связана с организацией оказания медицинской помощи сотрудникам ИВЛ и обеспечением их биологической безопасности при проведении работ с ПБА II – IV групп. Автор считает необходимым обратить особое внимание заведующих лабораториями на указанные им факты. **Ключевые слова:** биологическая безопасность, ветеринарные лаборатории, патогенные биологические агенты, особенности.

Compliance with biological safety requirements in veterinary testing laboratories when working with PBA groups II – IV

E.A. Tyurin, PhD in Medicine Science, Leading researcher
State Research Center for Microbiology and Biotechnology (Obolensk, Russia), info@obolensk.org

The paper considers the issue of organizing work in veterinary testing laboratories with infectious microorganisms of II-IV groups of pathogenicity, dangerous to humans and animals. The requirements and features of compliance with the provisions of biological safety are analyzed, factors affecting the safe performance of work and measures to reduce risks are identified. A survey of a number of ventilators revealed some shortcomings in the organization of their activities, which turned out to be common to many. They concerned both organizational and technical issues of equipment and operation of equipment, some of them were related to the organization of medical care for ventilator staff, ensuring their biological safety during work with PBAs of groups II-IV. The author considers it necessary to pay special attention to the facts indicated by him to the heads of laboratories. **Key words:** biological safety, veterinary laboratories, pathogenic biological agents, features.

DOI:10.30896/0042-4846.2025.28.6.55-61

Выполнение положений, правил и требований биологической безопасности в лабораториях различных уровней защиты должны соответствовать определенным условиям, обеспечивающим защиту персонала и охрану окружающей среды [1, 3, 7]. В соответствии с положениями санитарных правил и норм «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» 3.3686 – 21 работы с возбудителями инфекционных заболеваний II – IV групп патогенности опасных для человека и сельскохозяйственных животных следует проводить в испытательных ветеринарных лабораториях первого,

второго и третьего уровней защиты (базовых и изолированных лабораториях). Вопрос оценки соблюдения требований биологической безопасности, анализ выполняемых мероприятий и выявление особенностей эксплуатации зданий и сооружений, предназначенных для проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний – важное условие осуществления деятельности испытательных ветеринарных лабораторий (ИВЛ).

Безопасность работ с возбудителями инфекционных болезней человека и животных, относящимися ко II – IV группам патогенности (опасности) бактери-

альной и вирусной природы обеспечивается соответствующими нормативными требованиями [3]. Это касается таких опасных патогенных биологических агентов (ПБА) для человека и животных, как возбудители сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, мелиоидоза, сапа, ящура, бешенства, Ку-лихорадки и др.

Строгое соблюдение положений биологической безопасности (ББ) – актуально и требует регулярного контроля на фоне существующих особенностей функционирования ИВЛ, выявленных при их обследовании. Они относятся к организационным и техническим вопросам оснащения и эксплуатации, оказанию медицинской помощи сотрудникам этих лабораторий при проведении работ с ПБА II – IV групп.

Цель работы – проанализировать данные, полученные при обследовании ИВЛ разных уровней защиты, выявить их функциональные особенности, выработать предложения для улучшения их практической деятельности по соблюдению требований биологической безопасности.

Обследованные лаборатории, сотрудники которых работают с микроорганизмами бактериальной и вирусной природы, входили в состав учреждений и организаций ветеринарного назначения в субъектах РФ. В результате выявили ряд особенностей в обеспечении требований ББ в ИВЛ различных уровней защиты при проведении работ с ПБА II – IV групп.

Прежде всего, определили конкретные уровни ББ, касающиеся отдельных лабораторий, работающих с ПБА II – IV групп и с ПБА III – IV групп. Учреждения, сотрудники которых работали с возбудителями II группы патогенности (опасности) и другими ПБА, относились к крупным лабораториям областного подчинения. Другие организации, в ко-

торых проводили работы только с возбудителями III – IV групп патогенности, были лабораториями регионального и районного уровня. Областные лаборатории можно отнести к изолированным, региональные – к базовым.

В соответствии с концепцией биологической безопасности [2, 4] и положениями санитарно-эпидемиологических правил [3] все требования для оценки состояния ББ в различных ИВЛ разделили на несколько разделов: организационно-профилактический, медико-биологический и инженерно-технический. Это было сделано в соответствии с концепцией ББ [2, 4] и положениями санитарно-эпидемиологических правил [3].

Раздел организационно-профилактических мероприятий определял наличие документов, которые должны находиться в ИВЛ различного уровня. Это устав, лицензии, санитарно-эпидемиологическое заключение, приказы о допуске персонала к работам с ПБА II – IV групп, приказ о создании комиссии по контролю соблюдения требований ББ и протоколов заседаний, оперативный план ликвидации последствий возможных аварий при работе с ПБА II – IV групп, программы проведения производственного контроля. К этому же разделу отнесли документы, подтверждающие квалификацию сотрудников: дипломы о высшем и среднем специальном образовании, свидетельства, удостоверения и сертификаты о повышении квалификации. Отдельно рассматривали инструкции по соблюдению требований ББ при работе в лаборатории, стандартные операционные процедуры (СОП), журнал контроля доступа в лабораторию персонала и сторонних лиц.

Инженерно-техническое оснащение лаборатории отнесли к разделу инженерно-технических мероприятий. Они касались планировки рабочих зон лабо-

ратории («чистая»/«заразная») и контура герметизации с приборами контроля, наличия охранных решеток на окнах, аварийной, пожарной и охранной сигнализаций в «чистой» и «заразной» зонах, расстановки оборудования в «заразной» зоне, паспортов на приточные и вытяжные системы вентиляции, договоров со сторонними организациями на обслуживание и контроль эффективности работы вентиляционных систем и фильтров тонкой очистки воздуха, актов и протоколов проверки качества защиты оборудования, систем и аппаратов, размещения боксов микробиологической безопасности (БМБ), протоколов по оценке их работы, а также умению сотрудников готовить их к работе и ими пользоваться. Обращали внимание на проведение дезинфекционных мероприятий: контроль концентрации маточных и рабочих дезинфицирующих растворов, работу УФ-ламп, паровых стерилизаторов для обеззараживания твердых отходов, анализировали протоколы поверки средств измерения и аттестации устройств и приборов. Оценивали количество и качество имеющихся типов рабочей и защитной одежды, средств индивидуальной защиты (СИЗ) и порядок их обращения.

В рамках третьего раздела – медико-биологического обеспечения требований ББ проверяли наличие договоров с территориальным медицинским учреждением на обслуживание и госпитализацию сотрудников при подозрении на инфекционное заболевание, вызванное микроорганизмами II группы патогенности, проведение и учет необходимых профилактических прививок против сибирской язвы и вирусных инфекций, размещение и комплектацию аварийных аптек, журнала входного медицинского контроля с данными о термометрии персонала, акта по результатам ежегод-

ного профилактического медицинского осмотра и оформленных медицинских книжек у сотрудников лаборатории.

В ходе обследований выявили несоответствия требованиям ББ в ИВЛ, которые присутствовали практически повсеместно.

Инспекцию начинали с осмотра зданий, размещенных в них помещений, состояния ограждающих конструкций: стен, потолков, полов, дверей, качество отмостки у стен, благоустройства территории вокруг здания, наличие решеток на окнах. Современные лаборатории ветеринарной службы проектируют и строят с учетом технических заданий и рекомендаций для зданий и помещений, используемого оборудования, средств индивидуальной защиты, программ подготовки персонала, мер обеспечения пожарной, охранной и аварийной безопасности для сотрудников и окружающей среды.

Выявили, что часть ИВЛ находится в специально построенных зданиях, а часть размещена в строениях, приспособленных под лаборатории. Территория вокруг в большинстве мест была благоустроена, но в некоторых этого не было. Еще одна особенность – внутри отдельных лабораторий отсутствовали четкое разделение на «чистую» и «заразную» зоны, а также первичный и вторичный контуры герметизации. «Чистая» зона сообщалась с «заразной» через передаточное окно, а не через шлюз, что является нарушением правил передачи материала на исследование из помещения приема образцов, и это при возникновении аварийной ситуации может привести к заражению окружающей среды – реальный риск и угроза.

При входе в лабораторию персонала и сторонних лиц входной температурный контроль сотрудников, особенно тех, которые работают с микроорганизмами

II группы патогенности (возбудители сибирской язвы, бруцеллеза, бешенства), проводили с нарушением требований ББ – не было журнала измерения температуры. Сторонних лиц не вносили в журнал посещений лаборатории, им не проводился входной инструктаж.

При проверке разрешительных документов оказалось, что в некоторых лабораториях представленные санитарно-эпидемиологические заключения бессрочные (не указан срок действия), но бессрочной может быть только лицензия, а все заключения должны иметь срок действия (до пяти лет) [3]. На рабочих местах не было инструкций по соблюдению требований ББ при проведении операций и манипуляций с микроорганизмами на приборах, центрифугах, в БМБ и т.п.

Нарушением правил соблюдения ББ считали отсутствие в «заразной» зоне ИВЛ некоторых инженерных систем. Если же системы и были установлены, то проверку работоспособности и оценку их защитной эффективности проводили нерегулярно. Зачастую сотрудники, проводившие оценку, не имели представления о том, с чем работают в ИВЛ, как должна функционировать та или иная инженерная система, обеспечивающая ББ. В некоторых лабораториях трубопроводы вентиляционных систем оказались не промаркированными (приток/вытяжка), конечные высокоэффективные фильтры тонкой очистки воздуха типа HEPA на вытяжных воздуховодах не соответствовали классу защиты H14, а были ниже (H11) или отсутствовали. Кроме того, фильтра-камеры были установлены без прямого доступа для технического обслуживания, что затрудняло выполнение контрольных замеров и замену фильтров при необходимости.

Микробиологический бокс – основное рабочее помещение «заразной»

зоны для манипуляций с ПБА. Это помещение с предбоксом для входа, достаточной площади, оборудовано естественным и искусственным освещением, устойчивой к воздействию моющих и дезинфицирующих растворов мебелью и УФ-облучателями. Основным инженерным элементом защиты сотрудников в таком боксе при работе с ПБА является бокс микробиологической безопасности (БМБ) 2 класса типа «А». В настоящее время БМБ наряду с защитной одеждой и профилактическими прививками – основной элемент защиты работающего персонала, а их правильная эксплуатация – залог соблюдения требований ББ. Для работы с микроорганизмами II группы патогенности помещение микробиологического бокса следует оборудовать общеобменной приточно-вытяжной вентиляцией с фильтрами очистки воздуха класса защиты не ниже H13 на притоке и H14 на выходе. Кроме этого, в микробиологическом боксе ИВЛ могут быть установлены БМБ II класса типа «Б» с подключением к вытяжному воздуховоду системы вентиляции. Это повышает безопасность работы с ПБА.

БМБ II класса того или иного типа установлены практически во всех лабораториях, но работающий в них персонал недостаточно подготовлен. Например, они не знали, что такое «дымовой тест» оценки динамичного входящего воздушного потока, с какой целью, как и когда его выполняют. Некоторые приемы работы сотрудников лабораторий были неприемлемы для БМБ, так как их никто не обучал правилам их проведения.

Еще одна особенность соблюдения требований ББ в ИВЛ – использование защитных устройств (боксов), не имеющих государственной регистрации в качестве защитных устройств для работ с ПБА и не отвечающих требованиям ББ.

Отсутствие в некоторых лабораториях предбоксов приводило к тому, что раковины для мытья рук устанавливали непосредственно в микробиологических боксах. Соответственно холодная и горячая вода поступала в «заразное» помещение лаборатории без отсечки от магистрального водопровода, а стоки из микробиологических помещений от раковин уходили в канализационную сеть без предварительного химического или термического обеззараживания.

Персонал лабораторий в качестве рабочей и защитной одежды использовал пижамы, костюмы хирургические и другие доступные комплекты даже при работе в БМБ или с биопробными животными. В некоторых лабораториях второго или даже третьего уровня в качестве защитной одежды надевали одноразовые хирургические халаты из нетканого материала, предназначенные только для работы на первом базовом уровне.

Средствами индивидуальной защиты органов дыхания для персонала ИВЛ служили хирургические маски, что является нарушением требований ББ при работе с микроорганизмами. Хирургическая маска не защищает верхние дыхательные пути и слизистые человека от аэрозоля микроорганизмов, так как не соответствует 3 классу безопасности (FFP3).

Ветеринарные лаборатории должны быть оборудованы системами и средствами пожарной, охранной и аварийной сигнализации. С ними связаны некоторые особенности эксплуатации. Если к первым двум претензий не было, за исключением отсутствия в некоторых лабораториях решеток на окнах первого этажа, то с аварийной световой и звуковой сигнализацией дело обстояло иначе. В некоторых случаях аварийная сигнализация отсутствовала вообще при следующей мотивации: лаборатория маленькая, народу немного, «до-

кричимся». Зачастую кнопка оповещения об аварии находилась в коридоре, а не у рабочего места, аварийный извещатель был только один и находился в коридоре «заразной» зоны без дополнительного вывода сигнала в «чистую».

Так как организация мероприятий по ликвидации последствий аварий – обязательное требование ББ при проведении работ с ПБА независимо от группы патогенности, то необходимо иметь планы ликвидации последствий аварий, аварийные комплекты защитной одежды и растворы дезинфектантов в микробиологических боксах. Отсутствие этих материалов в ИВЛ – еще одно нарушение при проведении работ с ПБА.

Диагностические исследования доставленного материала на биопробных животных в условиях бактериологических или вирусологических ИВЛ – важная часть работы лабораторий. Как показала практика, биопробных зараженных животных содержат в условиях, позволяющих проводить необходимые манипуляции, включающие заражение, содержание и при необходимости вскрытие. Однако, очень часто животных (в основном мышей) содержат в стеклянных банках, в помещениях без приточно-вытяжной вентиляции или же в клетках, которые не пригодны для этих целей. Клетки изоляторы/укрытия, помещаемые в боксы укрытия для содержания животных не используют. Вскрытие поступивших для исследования особей проводят на столах, а не в БМБ, без защитных приспособлений. Это подчеркивает отсутствие знаний хотя бы в рамках начальной подготовки специалистов ИВЛ с основами ББ.

Оценивая соблюдение требований ББ в ИВЛ при работе с ПБА, установили, что у большинства сотрудников отсутствует дополнительная начальная профессиональная подготовка с основами

биологической безопасности в объеме 500 часов, а это в соответствии с положениями Сан Пин 3.3686 – 21 является обязательным условием для работников лабораторий [3]. Специализация, а вернее, повышение квалификации, осуществляющееся только на базе теоретического курса (72 часа) без освоения и закрепления практических приемов и навыков безопасной работы с патогенными микроорганизмами, не отвечает в полной мере правилам безопасной работы с ПБА, а у сотрудников лабораторий нет всеобъемлющего понимания вопросов биологической безопасности.

Уровень подготовленности персонала ИВЛ для проведения профессиональных исследований и их действий при ликвидации возможных аварийных ситуаций и аварий, которые могут произойти во время работы с микроорганизмами является, наверное, самым важным для соблюдения требований ББ. В одном из ветеринарных управлений Московской области после прохождения курсов повышения квалификации провели аттестацию специалистов для оценки степени усвоения материала. Разработали тестовые задания по принципу вопрос – несколько ответов, один из которых верный. В задания входило до 30 вопросов для лаборантов и до 50 для врачей. Вопросы были как общего, так и практического плана. Результаты показали, что специалисты с высшим и средним специальным образованием достаточно успешно справились с тестовыми заданиями [6].

Дезинфекцию в лабораториях при работах с ПБА II – IV групп и материалами с подозрением на их содержание проводили различными дезинфицирующими средствами. Рабочие растворы дезинфектантов хранили в емкостях без указания даты приготовления, инструкций по проверке рабочих растворов зачастую не было. Не во всех ИВЛ имелись одноразо-

вые экспресс тест-полоски для проверки концентраций рабочих дезинфицирующих растворов. Все это могло привести к неправильному их использованию при проведении работ с ПБА и при ликвидации последствий аварийной ситуации.

Анализируя дезинфекционные препараты, используемые в лабораториях, установили, что закупки их проводили без учета задач, стоящих перед сотрудниками, а по принципу «что дешевле». На первом месте в данном случае должна стоять безопасность, которая достигается использованием правильного дезинфицирующего средства. До настоящего времени таковыми продолжают оставаться растворы перекиси водорода различной концентрации. Особенно это важно помнить при проведении работ с возбудителем *Bac. anthracis* или материалом, подозрительным на содержание спор сибирской язвы [3, 5].

Выявленные и перечисленные недостатки в выполнении и обеспечении требований ББ можно считать типичными и на них следует обратить особое внимание руководства лабораторий. В основном они сводились к следующему: размещение некоторых ИВЛ в зданиях довоенной или послевоенной постройки, как-то приспособленных для этой деятельности; частичное или полное отсутствие инженерных систем ББ или отдельных их элементов; только теоретическая подготовка персонала на курсах повышения квалификации без закрепления практических приемов и навыков безопасной работы с ПБА и отсутствие обязательного обучения специалистов начальной профессиональной подготовке с основами ББ; работа в одноразовых халатах и шапочках в защитных боксирующих устройствах без специальной защитной одежды; использование хирургических масок вместо респираторов третьего класса защиты (FFP3);

удаление и слив сточных вод из «заразной» зоны в общую канализационную сеть; вскрытие животных на открытых столах без местных элементов вытяжной системы вентиляции; отсутствие нормативных документов Федерального уровня по соблюдению требований ББ при проведении работ с ПБА II – IV групп общих для человека и животных.

Заключение. Выявленные при обследовании ИВЛ недоработки могут стать причиной аварийных ситуаций, которые, в свою очередь, способны привести к заболеванию сотрудников и выходу микроорганизмов в окружающую среду. Руководителям ИВЛ необходимо обратить пристальное внимание на неукоснительное соблюдение требований биологической безопасности при проведении работ с ПБА II – IV групп.

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биобезопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях. 6-е изд. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. CDC. 2020.
2. Дмитриева В.А., Воронин А.М., Дмитриев В.В., Доброхотский О.Н. и др. Учебное пособие по биобезопасности. Тула: Изд-во ТулГУ, 2013; 500 с.
3. Санитарные нормы и правила «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» Сан Пин 3.3686 – 21. 2021; 1092 с.
4. Тюрин Е.А. Организация условий соблюдения требований биологической безопасности при проведении работ с микроорганизмами I – IV групп патогенности в микробиологических лабораториях различных уровней защиты. Правовые основы биоэкономики и биобезопасности. М.: «Проспект», 2020; 110 – 121. ISBN 978-5-392-31094-4.
5. Тюрин Е.А., Большан И.Е., Чебан Л.В. и др. Алгоритм мониторинга соблюдения требований биологической безопасности в лабораториях различного уровня защиты ветеринарной практики. Бактериология. 2021; 6(1): 32 – 36.
6. Тюрин Е.А., Благодатских С.А., Квочко П.С. Оценка состояния профессиональной подготовки для снижения биологических рисков у сотрудников ветеринарных испытательных лабораторий. Бактериология. 2023; 8 (2):79 – 82. DOI:10.20953/2500-1027-2023-2-79-82
7. Laboratory Biosafety Manual. Geneva: World Health Organization, 2020.

УДК 619:579.66

ОСНОВЫ СУБЛИМАЦИОННОЙ СУШКИ ЖИВЫХ ВАКЦИН

Нина Васильевна Никитина, к.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник, vnvip.nikitina@yandex.ru

Михаил Михайлович Трубицын, младший научный сотрудник, hawx_93@mail.ru

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

Статья содержит актуальную информацию о составе вспомогательных веществ (сред высушивания), используемых при сублимационной сушке живых вакцин для их стабилизации. Особое внимание уделено процессам замораживания и сушки. Проведенный анализ данных литературы и опыта работы будет полезным при разработке технологии производства иммунобиологических препаратов для профилактики инфекционных болезней. **Ключевые слова:** лиофилизация, живые вакцины, среды высушивания, технологические параметры.

Basics of freeze-drying live vaccines

N.V. Nikitina, PhD in Biology, Leading researcher, vnvip.nikitina@yandex.ru

M.M. Trubitsyn, Junior researcher, hawx_93@mail.ru

All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry Science – Branch of the Federal Scientific Center All-Russian Research and Technological Poultry Institute of Russian Academy of Sciences, (St. Petersburg – Lomonosov, Russia)

A review of literature data and scientific and practical information on the processes of freeze-drying of viral vaccines is presented. The article contains up-to-date information on the composition of auxiliary substances (drying media) used in the process of freeze-drying of live vaccines for their stabilization. Particular attention is paid to the processes of freezing and drying. The analysis of literature data will be useful in developing the technology for the production of immunobiological drugs for the prevention of infectious diseases. **Key words:** lyophilization, live vaccines, drying media, technological parameters.

DOI:10.30896/0042-4846.2025.28.61-64

Сублимационную сушку считают предпочтительным методом стабилизации живых вирусных вакцин. Изучение механизмов стабилизации и дестабилизации живых вирусов во время сублимационной сушки, подбор оптимальных компонентов рецептуры и параметров процесса все еще остаются актуальными. Отсутствие аналитических методов, позволяющих измерять физико-химические изменения в структуре антигена во время и после высушивания, представляют особую проблему при лиофилизации [10]. Тем не менее один из способов сохранения целевых свойств живых вакцин – получение их в твердой лекарственной форме посредством сублимационного высушивания. Впервые такую сушку применили для получения живой противостолбнячной вакцины [14]. На сегодня основная часть коммерческих живых вакцин, выпускаемых в твердой форме в медицине и ветеринарии, получена с использованием лиофилизации (РФ № 1212045, РФ № 2035917, CN 105233296 А). Надо учитывать, что обезвоживание препаратов сублимационным высушиванием (совокупность процедур заморозки и удаления влаги вакуумом) способно отрицательно воздействовать на целевые свойства живых вакцин. Поэтому подобное высушивание живых препаратов, как и большинство других технологических процедур с ними, требует оптимизации и должно быть максимально щадящим.

Цель данной статьи – представить обзор процесса лиофилизации, его преимуществ, а также возможность применения различных вспомогательных веществ, повышающих выживаемость микроорганизмов.

Собственно лиофилизацию можно разделить на три основные стадии: заморозка, первичное высушивание (сублимация) и вторичное высушивание (десорбция).

На начальной стадии **заморозки** устанавливают структуру продукта, а в ряде случаев и требуемые свойства получаемого вещества [1, 13, 16]. На текущий момент известно, что заморозка протекает по двум путям отвердевания: кристаллизация, основной особенностью которой служит организованность молекул, и аморфизация – преобладает пространственная дезориентация. Технически сушку проводят следующим образом: емкость с вакциной устанавливают на полку в сублимационной камере и линейно понижают температуру до требуемой [7]. В процессах заморозки, проходящих по пути кристаллизации, существует понятие температуры эвтектики. Под ней подразумевают наименьшее значение температуры, при которой определенная доля замораживаемого продукта еще находится в жидком состоянии. Последующее снижение температуры на 2 – 10 °С дает абсолютную кристаллизацию несвязанной влаги [16]. При замерзании продукта по механизму аморфизации введено понятие температуры стеклования, которое проявляется наибольшим сгущением твердой фракции [16]. Далее снижение температуры на 2 – 10 °С дает полную заморозку несвязанной влаги. В любом случае в отвердевшем веществе остается 5 – 20 % влаги, которая прочно связана с твердыми компонентами [1, 16].

На стадии **первичного высушивания** основное количество отвердевшей влаги выводится из вещества сублимацией за счет создания давления в сушильной установке. Показано, что вакуум в ней следует создавать ниже давления насыщенных паров отвердевшего вещества. В этом случае несвязанная жидкость переходит из замороженного состояния в пар, минуя жидкую стадию. Обратная процедура происходит в конденсаторе сушильной установки,

температура которого от минус 60 °С до минус 80 °С, что на 20 – 40 °С меньше аналогичного показателя в отсеке лиофилизации [8].

Интенсивность сублимации определяется рядом факторов – высотой лиофилизируемого вакцинного препарата [16]; структурой отвердевшего вещества (зависит от температурно-временных характеристик процедуры замораживания) [9]; площадью лиофилизируемого вещества [1]; температурой греющих полок и соответственно продукта. При увеличении данной характеристики интенсивность сублимации повышается [4].

Общепринято, что продолжительность этапа сублимации, при котором удаляют до 90 % всей влаги, определяется высотой лиофилизируемого вакцинного препарата в первичной упаковке. Результат сублимации зависит также от качественно-количественного состава вспомогательных веществ и температуры продукта. Необходимо, чтобы последняя не превышала значений его эвтектики или стеклования. Невыполнение этого условия может привести к полному или частичному оттаиванию лиофилизируемого вещества и возникновению эффекта коллапса. Для избежания этого, по данным А.А. Нежуты и

соавт. [6], высота высушиваемого препарата не должна превышать 12 мм. При этом количество остаточной влаги не опускается ниже критических значений и биопрепарат не повреждается. Следует отметить, что область эвтектики или стеклования индивидуальны для каждого биопрепарата. Сублимация прекращается при отборе всей отвердевшей несвязанной влаги.

Для десорбции связанной влаги увеличивают температуру продукта до тех пор, пока установится требуемый уровень остаточной влаги. Исследователями выявлено, что этот показатель определяется температурой десорбции и площадью продукта и не зависит от степени вакуума в сушильной установке и высоты лиофилизируемого вещества [8]. Большое значение имеет выбор температурно-временных параметров лиофилизации. Недостаточный нагрев биопрепарата удлинит процесс, а избыточный – может привести к оттаиванию вещества и возможной порче продукта. Ряд авторов констатируют, что для большинства микроорганизмов остаточная влажность должна находиться в пределах 1 – 2 % [2], а А.А. Нежута и Е.С. Сербис [5] утверждают, что рациональные температурно-временные режимы десорб-

Вспомогательные вещества для лиофилизации (по H.R. Constantino & M.J. Pikal [8])

| Группа веществ | Наименование вспомогательных веществ |
|------------------------|--|
| Наполнители | Сахара (маннитол, сахароза, глюкоза, трегалоза, лактоза, сорбитол, рафиноза) Аминокислоты (глицин, аргинин, гистидин) Полимеры (декстран, полиэтиленгликоль) |
| Буферные растворы | Лимонная кислота, натрий лимоннокислый, калий лимоннокислый. Натрий фосфорнокислый, трис-НСI, трис-ацетатный буфер, хлорид цинка, ацетат натрия, ацетат калия, аргинин |
| Регуляторы pH | Соляная кислота, гидроксид натрия |
| Регуляторы тоничности | Хлорид натрия, глицерол, маннитол, сахароза, глицин |
| Модификаторы структуры | Маннитол, поливинилпирролидон |
| Стабилизаторы | Сахароза, глюкоза, трегалоза, маннит, манноза, лактоза, декстран, гидроксизетилкрахмал, полиэтиленгликоль, полисорбаты (полисорбат-20, полисорбат-80), глицин, аргинин, лейцин, серин, натрия глутамата моногидрат |
| Ингибиторы разрушения | Декстран, желатин, гидроксизетилкрахмал, фиколл (полисахароза) |

ции и уровень остаточной влажности для каждого вида биопрепаратов следует подбирать экспериментально.

Известно, что на выживаемость микроорганизмов при лиофилизации влияет качественный и количественный состав сред высушивания. Используемые вспомогательные вещества делят на несколько групп. Наполнители – создание матрицы для основного вещества; буферные растворы – контроль pH; регуляторы тоничности – для контроля осмотического давления; модификаторы структуры – для улучшения характеристик матрицы с целью лучшего преодоления сопротивления потоку пара; стабилизаторы – для защиты основного вещества от пересушивания и воздействия низких температур; ингибиторы разрушения – для повышения температуры, при которой может произойти разрушение структуры высушиваемого продукта [3].

Спектр применяемых вспомогательных веществ достаточно широк, а их количественно-качественные соотношения разнообразны [11, 15] (см. таблицу).

В качестве первичной упаковки лиофилизированных вакцинных препаратов используют в основном флаконы, так как их герметизация предусмотрена непосредственно в камере лиофилизатора.

Хотим отметить, что появились экспериментальные работы по внедрению технологии вакуумной сушки живых вакцин [12]. Суть процесса в том, что обезвоживание осуществляют при давлении препарата выше давления тройной точки воды, без его замораживания. В качестве стабилизаторов рекомендуют использовать комбинации трегалозы, метионина и желатина. Авторы указывают, что при такой технологии (вакуумной сушке) получают большую жизнеспособность микроорганизмов и лучшую иммуногенность конечного продукта [12].

Заключение. Анализ научной литературы и патентов по технологии лиофилизации живых вакцин показал разнообразие температурно-временных параметров процесса и качественно-количественного состава защитных сред. От правильного их выбора зависит сохранение инфекционной активности сухих вирусных вакцин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гусаров Д.А. Лиофилизация биофармацевтических белков (мини-обзор). *Биофармацевтический журнал*. 2010; 2(5):3 – 7.
2. Ефременко А.А. Разработка биотехнологии вакцины чумной живой сухой со сниженным количеством члеников в производственной упаковке (ампуле): Дис. ... канд. мед. наук. Ставрополь. 2005; 124 с.
3. Могилюк В. Аспекты лиофилизационной сушки водных растворов. *Фармацевтическая отрасль*. 2014; 5(46):46 – 53.
4. Нежута А.А. Научное обоснование и методика разработки и совершенствования промышленной технологии сублимационного высушивания биопрепаратов: Дис. ... д-ра биол. наук. Щелково, 2003; 243 с.
5. Нежута А.А., Сербис Е.С. Разработка научно обоснованных режимов сублимационной сушки биопрепаратов. *Биотехнология*. 2001; 6:59 – 67.
6. Нежута А.А., Токарик Э.Ф., Самуйленко А.Я. Теоретические и практические основы технологии сублимационного высушивания биопрепаратов. Курск: Изд-во КГСХА, 2002; 239 с.
7. Cochran T., Nail S.L. Ice nucleation temperature influences recovery of activity of a model protein after freeze-drying. *J. Pharm. Sci.* 2009; 98:3495 – 3498.
8. Constantino H.R., Pikal M.J. *Lyophilization of biopharmaceuticals*. –Arlington, VA, USA: AAPS Press. 2004; 686 p.
9. Franks F., Auffret T. *Freeze-Drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals*. Cambridge, UK: RSC Publishing. 2007; 220 p.
10. Hansen L., Daoussi K., Vervaeke C. Freeze drying of live virus vaccines: a review. *Vaccine*. 2015; 33(42):5507 – 5519.
11. Holm T.P., Meng-Lund H., Rantanen J., Jorgensen L. et al. Screening of novel excipients for freeze-dried protein formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2021; 160:55 – 64.
12. Ohtake S., Martin R., Saxena A., Pham B. et al. Room temperature stabilization of oral, live attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi-vectored vaccines. *Vaccine*. 2011; 29(15):2761 – 2771.
13. Pikal M.J., Rambhatla S., Ramot R. The impact of the freezing stage in lyophilization: Effects of the ice nucleation temperature on process design and product quality. *Am. Pharm. Review*. 2002; 5:48 – 53.
14. Shackell L.D. An improved method of desiccation, with some applications to biological problems. *Am. J. Physiol.* 1909; 24:325 – 340.
15. Startzel P. Arginine as an Excipient for Protein Freeze-Drying: A Mini Review. *J. Pharm. Sci.* 2018; 107:960 – 967.
16. Tang X., Pikal M. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: Practical advice. *Pharm. Res.* 2004; 21:191 – 200.



БРОМКОЛИН®

колистин - 300000 МЕ, линкомицин - 100 мг, бромгексин - 5 мг



СВОБОДНОЕ ДЫХАНИЕ



производство
МОСАГРОГЕН
ветеринарные препараты



+7(495) 744-0645
www.mosagrogen.ru

СТРАЙД

Прыжок в здоровое
будущее!



СТРАЙД – кормовая добавка в виде суспензии
для оптимизации и поддержания работы опорно-двигательного
аппарата у собак

4 КЛЮЧЕВЫХ КОМПОНЕНТА для поддержания здоровья суставов

глюкозамин

МСМ*

хондроитин

гиалуроновая
кислота

- ✓ Кормовая добавка в жидкой форме, которую легко скармливать собаке
- ✓ Не содержит компонентов животного происхождения
- ✓ Вкусный натуральный дрожжевой аромат
- ✓ Проверено на практике

* Метилсульфонилметан

Форма выпуска: 200 мл и 500 мл



Производитель:
Thoroughbred Remedies Manufacturing Ltd.,
Ирландия



NEVA VET
группа компаний