



ФГБУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ
ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ
И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ
(РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)

ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

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

VETERINARY SCIENCE TODAY

СЕНТЯБРЬ | SEPTEMBER ТОМ 15 № 3 2026

SCIENTIFIC JOURNAL



БЕШЕНСТВО ЖИВОТНЫХ

veterinary.arriah.ru/jour
DOI 10.29326/2304-196X



Филогенетический анализ изолятов
вируса бешенства, выявленных на
территории Новосибирской области
(Российская Федерация)

стр. 252

Разработка тест-системы для выявления генома
вируса бешенства на основе ПЦР в режиме реального
времени с использованием эндогенного контроля:
теоретический дизайн и оптимизация

стр. 262

ЦЕЛИ И ОБЛАСТЬ (ТЕМАТИЧЕСКИЙ ОХВАТ)

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

Журнал ориентирован на ученых, занимающихся фундаментальными и прикладными исследованиями в области общей и ветеринарной вирусологии, эпизоотологии, иммунологии, микологии, микотоксикологии, бактериологии, практикующих ветеринарных врачей и врачей ветеринарных лабораторий и государственных ветеринарных служб, преподавателей вузов ветеринарной, биологической, медицинской направленностей, аспирантов и студентов вузов и колледжей.

AIMS AND SCOPE

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

The journal is intended for scientists engaged in fundamental and applied research in the field of general and veterinary virology, epizootology, immunology, mycology, micotoxycology, bacteriology, as well as practicing veterinarians and doctors of veterinary laboratories and state veterinary services, university-level teachers for veterinary, biological, medical specializations, graduate and postgraduate students.

ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ

Veterinariia segodnia

ПЕРИОДИЧНОСТЬ: 4 раза в год

СЕНТЯБРЬ ТОМ 15 № 3 2026

Основан в 2012 г.

VETERINARY SCIENCE TODAY

FREQUENCY: 4 times a year

SEPTEMBER VOLUME 15 No. 3 2026

Published since 2012

Научный журнал «Ветеринария сегодня» входит в «Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук» по научным специальностям:

- 1.5.10 Вирусология (ветеринарные науки);
- 4.2.3 Инфекционные болезни и иммунология животных (ветеринарные науки).

Научный журнал «Ветеринария сегодня» включен в информационно-аналитическую систему РИНЦ, каталог журналов открытого доступа DOAJ, в список журналов, входящих в базу данных RSCI (Russian Science Citation Index), в библиографическую и реферативную базу данных Scopus.

Электронные версии журнала размещаются в полнотекстовом формате на сайте Научной электронной библиотеки (НЭБ) eLIBRARY.RU, в каталоге DOAJ и по адресу <https://veterinary.arriah.ru/jour>

Scientific Journal "Veterinary Science Today" is included in the scientometric system – Russian Science Citation Index (RSCI), Directory of Open Access Journals (DOAJ), as well as in the RSCI database, in the Scopus bibliographic and abstract database.

Full-text e-versions of the Journal are published on the website of the scientific electronic library eLIBRARY.RU, DOAJ, and <https://veterinary.arriah.ru/jour>

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

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

Выпускающий редактор: Никешина Татьяна, канд. биол. наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: nikeshina@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0959-5915>; AuthorID: 768521; Тел: 8 (4922) 26-15-12, доб. 22-27
Фото на обложке: Dgwildlife / Getty Images

Редакционная коллегия:

Болдбаатар Базарцэрэн — PhD в области ветеринарии, Монгольский университет естественных наук, г. Улан-Батор, Монголия; <https://orcid.org/0000-0002-6137-7990>; Scopus Author ID: 26634733300; ResearcherID: [IRJN-9905-2023](https://orcid.org/0000-0002-6137-7990)

Василевич Федор Иванович — д-р вет. наук, профессор, академик РАН, ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологий — МВА им. К. И. Скрябина», г. Москва, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-0786-5317>; AuthorID: 285556; Scopus Author ID: 57190309524; ResearcherID: [K-9491-2015](https://orcid.org/0000-0003-0786-5317)

Глотов Александр Гаврилович — д-р вет. наук, профессор, член-корреспондент РАН, ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН», пос. Краснообск, Новосибирская обл., Россия; <https://orcid.org/0000-0002-2006-0196>; AuthorID: 236129; Scopus Author ID: 7004340265; ResearcherID: [L-7720-2017](https://orcid.org/0000-0002-2006-0196)

Гринь Светлана Анатольевна — д-р биол. наук, профессор, член-корреспондент РАН, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», г. Щелково, Россия; <https://orcid.org/0009-0000-8984-7002>; AuthorID: 563647; ResearcherID: [B-2813-2018](https://orcid.org/0009-0000-8984-7002)

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

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

Иголкин Алексей Сергеевич — канд. вет. наук, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>; AuthorID: 721219; Scopus Author ID: 56469415600; ResearcherID: [GZN-0688-2022](https://orcid.org/0000-0002-5438-8026)

Ирза Виктор Николаевич — д-р вет. наук, доцент, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-7489-1772>; AuthorID: 332278; Scopus Author ID: 24279315500

Кононов Александр Владимирович — д-р вет. наук, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-5523-3261>; AuthorID: 768208; Scopus Author ID: 56411709300

Красочко Петр Альбинович — д-р вет. наук, д-р биол. наук, профессор, УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Беларусь; <https://orcid.org/0000-0002-4641-4757>; AuthorID: 751960; Scopus Author ID: 6504022390

Кузьмина Елена Васильевна — д-р вет. наук, Краснодарский научно-исследовательский ветеринарный институт — обособленное структурное подразделение ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии», г. Краснодар, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-4744-0823>; AuthorID: 359696; Scopus Author ID: 57192088323; ResearcherID: [AAO-7813-2020](https://orcid.org/0000-0003-4744-0823)

Ломако Юрий Михайлович — канд. вет. наук, доцент, РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелеского», г. Минск, Беларусь; <https://orcid.org/0000-0002-9611-8286>; AuthorID: 1049578; Scopus Author ID: 55996656700; ResearcherID: [AAE-5001-2019](https://orcid.org/0000-0002-9611-8286)

Макаров Владимир Владимирович — д-р биол. наук, профессор, ФГБУ «Центр ветеринарии», г. Москва, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-8464-6380>; AuthorID: 78150; Scopus Author ID: 7401689971

Махамат Нгуерабе Ямтитина — д-р вет. наук, Комратский государственный университет, г. Комрат, Молдова; <https://orcid.org/0000-0002-2738-0408>; AuthorID: 1064174

Мищенко Владимир Александрович — д-р вет. наук, профессор, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-3751-2168>; AuthorID: 762858; Scopus Author ID: 7103128956; ResearcherID: [AAU-7410-2021](https://orcid.org/0000-0003-3751-2168)

Мищенко Наталья Владимировна — д-р биол. наук, доцент, ФГБОУ ВО «Владимирский государственный университет им. А. Г. и Н. Г. Столетовых», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-3643-3129>; AuthorID: 66095; Scopus Author ID: 7004534956; ResearcherID: [AHB-4663-2022](https://orcid.org/0000-0002-3643-3129)

Настасиевич Иван — PhD в области ветеринарии, Институт гигиены и технологии мяса, г. Белград, Сербия; <https://orcid.org/0000-0002-7141-269X>; SciProfiles: 2500444; Loop profile: 1914298; Scopus Author ID: 8630551700; ResearcherID: [AGJ-7566-2022](https://orcid.org/0000-0002-7141-269X)

Недосеков Виталий Владимирович — д-р вет. наук, профессор, Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев, Украина; <https://orcid.org/0000-0001-7581-7478>; AuthorID: 94733; Scopus Author ID: 57189580555; SciProfiles: 2357633; ResearcherID: [ABE-7283-2020](https://orcid.org/0000-0001-7581-7478)

Никитин Иван Николаевич — д-р вет. наук, ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-3981-0882>; AuthorID: 768437; Scopus Author ID: 58616318800; ResearcherID: [F-5330-2019](https://orcid.org/0000-0002-3981-0882)

Плющиков Вадим Геннадьевич — д-р с.-х. наук, профессор, Аграрно-технологический институт, ФГАУ ВО «Российский университет дружбы народов», г. Москва, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-2057-4602>; AuthorID: 410076; Scopus Author ID: 35410040100; ResearcherID: [V-4141-2017](https://orcid.org/0000-0003-2057-4602)

Пронин Валерий Васильевич — д-р биол. наук, профессор, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», пос. Вольгинский, Владимирская область, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-6240-3062>; AuthorID: 666636; Scopus Author ID: 57878337900; ResearcherID: [C-3433-2014](https://orcid.org/0000-0002-6240-3062)

Прохватилова Лариса Борисовна — канд. биол. наук, доцент, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-9560-0724>; AuthorID: 49638; Scopus Author ID: 17346898000; ResearcherID: [JAC-6920-2023](https://orcid.org/0000-0002-9560-0724)

Прунтова Ольга Владиславовна — д-р биол. наук, профессор, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-3143-7339>; AuthorID: 416163; Scopus Author ID: 6504372679

Равилов Рустам Хаматович — д-р вет. наук, профессор, ФГБОУ ВО «Казанский государственный аграрный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-7210-7470>; AuthorID: 417736; Scopus Author ID: 6506697664; ResearcherID: [Q-1810-2015](https://orcid.org/0000-0001-7210-7470)

Русалеев Владимир Сергеевич — д-р вет. наук, профессор, г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-4972-6326>; AuthorID: 731801; Scopus Author ID: 57219163783

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

Самарджия Марко — PhD в области ветеринарии, профессор, Загребский университет, факультет ветеринарной медицины, г. Загреб, Хорватия; <https://orcid.org/0000-0003-0402-3173>; Scopus Author ID: 8410731800; ResearcherID: [ACB-2749-2022](https://orcid.org/0000-0003-0402-3173); SciProfiles: 652922

Сидорчук Александр Андреевич — д-р вет. наук, профессор, г. Москва, Россия; AuthorID: 508887; Scopus Author ID: 57191965356

Соколович Марьяна — PhD в области ветеринарии, Хорватский ветеринарный институт, Центр птицеводства, г. Загреб, Хорватия; <https://orcid.org/0000-0003-3373-7415>; Scopus Author ID: 21835149800; SciProfiles: 1947001; ResearcherID: [Y-8635-2019](https://orcid.org/0000-0003-3373-7415)

Старов Сергей Константинович — канд. вет. наук, старший научный сотрудник, заместитель главного редактора, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; AuthorID: 596191; Scopus Author ID: 6507314336

Субботин Александр Михайлович — д-р биол. наук, профессор, УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Беларусь; <https://orcid.org/0000-0002-2449-0097>; AuthorID: 709795

Сулейманов Сулейман Мухитдинович — д-р вет. наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет им. императора Петра I», г. Воронеж, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-0461-9885>; AuthorID: 80671; Scopus Author ID: 57204718558

Федотов Сергей Васильевич — д-р вет. наук, профессор, ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет — МСХА имени К. А. Тимирязева», г. Москва, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-0004-3639>; AuthorID: 460625; Scopus Author ID: 58822775800

Чвала Илья Александрович — канд. вет. наук, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>; AuthorID: 705819; Scopus Author ID: 57204228517; SciProfiles: 2392489; ResearcherID: [K-5603-2016](https://orcid.org/0000-0002-1659-3256)

Шахов Алексей Гаврилович — д-р вет. наук, профессор, член-корреспондент РАН, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии», г. Воронеж, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-6177-8858>; AuthorID: 605505; Scopus Author ID: 7005636727; ResearcherID: [AAA-8731-2020](https://orcid.org/0000-0002-6177-8858)

Шкуратова Ирина Алексеевна — д-р вет. наук, профессор, член-корреспондент РАН, Уральский НИВИ — структурное подразделение ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-0025-3545>; AuthorID: 482688; Scopus Author ID: 57192078353; ResearcherID: [AAD-3416-2022](https://orcid.org/0000-0003-0025-3545)

Эрдэнэбаатар Жанчивдорж — PhD в области ветеринарии, профессор, Институт ветеринарной медицины, г. Улан-Батор, Монголия; Scopus Author ID: 6602798556

Дизайн и верстка:

Кесаева Альбина

Ответственный редактор:

Гусева Елена

Редактор-координатор:

Власова Яна

Редакторы-корректоры:

Нурмухамбетова-Михайлова Юлия,
Рязузова Мария

Корректоры:

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

Тираж 1175 экземпляров. Цена свободная
 Подписку на научный журнал «Ветеринария сегодня» можно оформить через Агентство по подписке ООО «УРАЛ-Пресс Стандарт»: Подписной индекс — 83862; 127015, г. Москва, Новодмитровская ул., дом 5а, строение 4; 8 (499) 700-05-07, факс: 789-86-36 доб. 3777; e-mail: moscow@ural-press.ru

Учредитель: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Владимирская обл., г. Владимир, мкр. Юрьевец, ул. Гвардейская, д. 6
Издатель: ООО «Вейнард», 129626, г. Москва, проспект Мира, д. 102, стр. 31, комн. 12
Адрес редакции: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Владимирская обл., г. Владимир, мкр. Юрьевец, ул. Гвардейская, д. 6
Типография: ООО «Гран ПРИ», 152900, Ярославская область, г. Рыбинск, ул. Луговая, 7

Подписано в печать:
14 сентября 2026 года
Дата выхода в свет:
29 сентября 2026 года



© ФГБУ «ВНИИЗЖ»,
научное редактирование,
корректурка статей,
2026

Creative Commons
Attribution 4.0 License



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

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

Executive Editor: Tatiana Nikeshina, Cand. Sci. (Biology), Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; e-mail: nikeshina@arriah.ru; AuthorID: 768437; Scopus Author ID: 5861631880; ResearcherID: F-5330-2019

Cover photo: Dgwildlife / Getty Images

Editorial Board:

Boldbaatar Bazartseren – PhD/DVM, Mongolian University of Life Sciences, Ulan Bator, Mongolia; <https://orcid.org/0000-0002-6137-7990>; Scopus Author ID: 26634733300; ResearcherID: JRW-9905-2023

Fedor I. Vasilevich – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Academician of the RAS, Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA n. a. K. I. Skryabin, Moscow, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-0786-5317>; AuthorID: 285556; Scopus Author ID: 57190309524; ResearcherID: K-9491-2015

Alexander G. Glotov – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Corresponding Member of the RAS, Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk Region, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-2006-0196>; AuthorID: 236129; Scopus Author ID: 7004340265; ResearcherID: L-7720-2017

Svetlana A. Grin – Dr. Sci. (Biology), Professor, Corresponding Member of the RAS, All-Russian Research and Technological Institute of Biological Industry, Schelkovo, Russia; <https://orcid.org/0009-0000-8984-7002>; AuthorID: 563647; ResearcherID: B-2813-2018

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

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

Alexey S. Igolkina – Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>; AuthorID: 721219; Scopus Author ID: 56469415600; ResearcherID: GZN-0688-2022

Viktor N. Irza – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Associate Professor, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-7489-1772>; AuthorID: 332278; Scopus Author ID: 24279315500

Aleksandr V. Kononov – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-5523-3261>; AuthorID: 768208; Scopus Author ID: 56411709300

Petr A. Krasochko – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Dr. Sci. (Biology), Professor, The Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Belarus; <https://orcid.org/0000-0002-4641-4757>; AuthorID: 751960; Scopus Author ID: 6504022390

Elena V. Kuzminova – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Krasnodar Research Veterinary Institute – Detached Unit Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Krasnodar, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-4744-0823>; AuthorID: 359696; Scopus Author ID: 57192088323; ResearcherID: AAO-7813-2020

Yurij V. Lamaka – Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Associate Professor, Research Republican Unitary Enterprise the Institute of Experimental Veterinary Medicine n. a. S. N. Vysheslesky, Minsk, Belarus; <https://orcid.org/0000-0002-9611-8286>; AuthorID: 1049578; Scopus Author ID: 55996656700; ResearcherID: AAE-5001-2019

Vladimir V. Makarov – Dr. Sci. (Biology), Professor, Center of Veterinary, Moscow, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-8464-6380>; AuthorID: 78150; Scopus Author ID: 7401689971

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

Vladimir A. Mishchenko – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-3751-2168>; AuthorID: 762858; Scopus Author ID: 7103128956; ResearcherID: AAU-7410-2021

Natalia V. Mishchenko – Dr. Sci. (Biology), Associate Professor, Vladimir State University, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-3643-3129>; AuthorID: 66095; Scopus Author ID: 7004534956; ResearcherID: AHB-4663-2022

Ivan Nastasijevic – PhD/DVM, Institute of Meat Hygiene and Technology, Belgrade, Serbia; <https://orcid.org/0000-0002-7141-269X>; SciProfiles: 2500444; Loop profile: 1914298; Scopus Author ID: 8630551700; ResearcherID: AGJ-7566-2022

Vitalii V. Nedosekov – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine; <https://orcid.org/0000-0001-7581-7478>; AuthorID: 94733; Scopus Author ID: 57189580555; SciProfiles: 2357633; ResearcherID: ABE-7283-2020

Ivan N. Nikitin – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Kazan State Academy of Veterinary Medicine n. a. N. E. Bauman, Kazan, Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-3981-0882>; AuthorID: 768437; Scopus Author ID: 5861631880; ResearcherID: F-5330-2019

Vadim G. Plyushchikov – Dr. Sci. (Agricultural Science), Professor, Agrarian and Technological Institute, RUDN University, Moscow, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-2057-4602>; AuthorID: 410076; Scopus Author ID: 35410040100; ResearcherID: V-4141-2017

Valery V. Pronin – Dr. Sci. (Biology), Professor, Federal Research Centre for Virology and Microbiology, Volginsky, Vladimir Region, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-6240-3062>; AuthorID: 666636; Scopus Author ID: 57878337900; ResearcherID: C-3433-2014

Larisa B. Prokhvatilova – Cand. Sci. (Biology), Associate Professor, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-9560-0724>; AuthorID: 49638; Scopus Author ID: 17346898000; ResearcherID: JAC-6920-2023

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

Rustam K. Ravilov – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Kazan State Agricultural University, Kazan, Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-7210-7470>; AuthorID: 417736; Scopus Author ID: 6506697664; ResearcherID: Q-1810-2015

Vladimir S. Rusaleyev – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-4972-6326>; AuthorID: 731801; Scopus Author ID: 57219163783

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

Marko Samardžija – PhD/DVM, Professor, University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb, Croatia; <https://orcid.org/0000-0003-0402-3173>; Scopus Author ID: 8410731800; ResearcherID: ACB-2749-2022; SciProfiles: 652922

Alexander A. Sidorchuk – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Moscow, Russia; AuthorID: 508887; Scopus Author ID: 57191965356

Marijana Sokolovic – PhD/DVM, Croatian Veterinary Institute, Poultry Centre, Zagreb, Croatia; <https://orcid.org/0000-0003-3373-7415>; Scopus Author ID: 21835149800; SciProfiles: 1947001; ResearcherID: Y-8635-2019

Sergey K. Starov – Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Deputy Editor-in-Chief, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; AuthorID: 596191; Scopus Author ID: 6507314336

Alexander M. Subotsin – Dr. Sci. (Biology), Professor, The Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Belarus; <https://orcid.org/0000-0002-2449-0097>; AuthorID: 709795

Suleiman M. Suleymanov – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Honorary Scientist of the Russian Federation, Voronezh State Agrarian University n. a. Emperor Peter the Great, Voronezh, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-0461-9885>; AuthorID: 80671; Scopus Author ID: 57204718558

Sergei V. Fedotov – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-0004-3639>; AuthorID: 460625; Scopus Author ID: 58822775800

Ilya A. Chvala – Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>; AuthorID: 705819; Scopus Author ID: 57204228517; SciProfiles: 2392489; ResearcherID: K-5603-2016

Alexey G. Shakhov – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Corresponding Member of the RAS, All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-6177-8858>; AuthorID: 605505; Scopus Author ID: 7005636727; ResearcherID: AAA-8731-2020

Irina A. Shkuratova – Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Corresponding Member of the RAS, Ural Research Veterinary Institute – UrfASRC, UrB of RAS, Yekaterinburg, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-0025-3545>; AuthorID: 482688; Scopus Author ID: 57192078535; ResearcherID: AAD-3416-2022

Erdenebaatar Janchivdorj – PhD/DVM, Professor, Institute of Veterinary Medicine, Ulan Bator, Mongolia; Scopus Author ID: 6602798556

Design and composition:

Albina Kesaveva

Managing Editor:

Elena Guseva

Coordinating Editor:

Iana Vlasova

Content editors:

Julia Nurmukhambetova-Mikhailova,

Maria Ryaguzova

Proof-readers:

Karina Tulaeva, Julia Deryabina

The Journal "Veterinary Science

Today" is registered in the

Federal Service for Supervision

of Communications, Information

Technology, and Mass Media Federal

Service, Registration Certificate

No F5 77-49033, March 21, 2012.

Circulation: 1175. Price: unregulated

Veterinary Science Today Journal

can be subscribed through

the Ural-Press subscription agency:

Subscription code – 83862;

127015, Moscow, Novodmitrovskaya str.,

5a, str. 4; +7 (499) 700-05-07,

fax: 789-86-36 add. 3777;

e-mail: moscow@ural-press.ru

Founder: Federal Centre for Animal Health, 600901, Vladimir Oblast, Vladimir, Yur'evets, ul. Gvardeyskaya, 6

Publisher: Veinard, 129626, Moscow,

102 Prospect Mira, bld. 31, office 12

Editorial Staff Office: Federal Centre for Animal

Health, 600901, Vladimir Oblast, Vladimir,

Yur'evets, ul. Gvardeyskaya, 6

Printing Office: Grand Prix, 152900,

Yaroslavl Oblast, Rybinsk, Lugovaya str., 7

Approved for print:

September 14, 2026

Issued:

September 29, 2026

16+

© Federal Centre for Animal Health, scientific editing, proofreading of articles, 2026

Creative Commons Attribution 4.0 License



Содержание

ОБЗОРЫ | БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

216 Эпизоотическая геморрагическая болезнь жвачных: современные знания (обзор)
Т. Ю. Беспалова, Т. В. Михалева

226 Некоторые белки острой фазы при воспалительных процессах, в том числе в молочной железе коров (обзор)
М. Н. Исакова, Е. О. Кузнецова, Д. А. Оберюхтин

ОБЗОРЫ | БОЛЕЗНИ ЛОШАДЕЙ

236 Обзор клинических проявлений питиоза лошадей (*Pythium insidiosum*)
J. A. Silva Pinheiro

ОБЗОРЫ | БОЛЕЗНИ МЕЛКИХ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ

241 Этиология и патогенез лептоспироза: общие закономерности и особенности проявления у собак (обзор)
Д. А. Быковцева, С. В. Щербинин, Т. С. Галкина, К. Н. Груздев

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БЕШЕНСТВО ЖИВОТНЫХ

252 Филогенетический анализ изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Новосибирской области (Российская Федерация)
С. А. Чупин, Е. В. Чернышова, А. Д. Ботвинкин, И. Д. Зарва, И. А. Чвала, Н. А. Назаров, А. Д. Грехнева, И. М. Чередникова, М. А. Тимофеева

262 Разработка тест-системы для выявления генома вируса бешенства на основе ПЦР в режиме реального времени с использованием эндогенного контроля: теоретический дизайн и оптимизация
С. А. Чупин, Е. В. Чернышова, Е. А. Чуфарова

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БОЛЕЗНИ МЕЛКИХ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ

273 Цитокиновый профиль и баланс Th1/Th2-ответа в механизмах развития аутоиммунной патологии у собак с дирофиляриозом
И. О. Пивоварова, И. Г. Гламаздин, А. А. Руденко, В. И. Луцай

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

280 Разработка ПЦР-тест-систем для оценки распространенности генов антибиотикорезистентности у клостридий
Н. А. Безбородова, Т. И. Глотова, О. В. Соколова, И. А. Шкуратова, В. Д. Зубарева, Н. А. Мартынов, Е. В. Романов, А. Г. Глотов

290 Микробная этиология язвенных болезней копытного рога крупного рогатого скота
А. С. Метлева, Д. Д. Нагибина, В. Ю. Филатов

296 Реактивация культур микобактерий, выделенных из биоматериала животных и образцов внешней среды, с бактериологической, молекулярно-биологической и молекулярно-генетической идентификацией
С. В. Ионина, Е. И. Гордеева

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БИОТЕХНОЛОГИЯ

303 Подходы определения генетической последовательности РНК-содержащих вирусов из биологического материала с низкой копийностью на примере вирусов летучих мышей
К. А. Столбунова, М. А. Степанюк, А. Д. Мошкин, И. В. Попов, О. В. Охлопкова

Contents

REVIEWS | BOVINE DISEASES

- 216** Epizootic hemorrhagic disease of ruminants: current knowledge (review)
T. Yu. Bespalova, T. V. Mikhaleva
- 226** Some acute phase proteins in inflammatory processes, including those in mammary gland of cows (review)
M. N. Isakova, E. O. Kuznetsova, D. A. Oberyukhtin

REVIEWS | EQUINE DISEASES

- 236** An overview of clinical features of equine pythiosis (*Pythium insidiosum*)
J. A. Silva Pinheiro

REVIEWS | DISEASES OF SMALL PETS

- 241** Etiology and pathogenesis of leptospirosis: general patterns and features of manifestation in dogs (review)
D. A. Bykovtseva, S. V. Shcherbinin, T. S. Galkina, K. N. Gruzdev

ORIGINAL ARTICLES | ANIMAL RABIES

- 252** Phylogenetic analysis of rabies virus isolates recovered in the Novosibirsk Oblast (the Russian Federation)
S. A. Chupin, E. V. Chernyshova, A. D. Botvinkin, I. D. Zarva, I. A. Chvala, N. A. Nazarov, A. D. Grekhneva, I. M. Cherednikova, M. A. Timofeeva
- 262** Development of a test system for detection of the rabies virus genome using real-time PCR with an endogenous control: Theoretical design and optimization
S. A. Chupin, E. V. Chernyshova, E. A. Chufarova

ORIGINAL ARTICLES | DISEASES OF SMALL PETS

- 273** Cytokine profile and Th1/Th2 balance in the mechanisms of autoimmune pathology development in dogs with dirofilariasis
I. O. Pivovarova, I. G. Glamazdin, A. A. Rudenko, V. I. Lutsay

ORIGINAL ARTICLES | VETERINARY MICROBIOLOGY

- 280** Development of PCR test systems for assessment of antibiotic resistance gene prevalence in *Clostridium* spp.
N. A. Bezborodova, T. I. Glotova, O. V. Sokolova, I. A. Shkuratova, V. D. Zubareva, N. A. Martynov, E. V. Romanov, A. G. Glotov
- 290** Microbial etiology of ulcerative hoof disease in cattle
A. S. Metleva, D. D. Nagibina, V. Yu. Filatov
- 296** Reactivation of mycobacterial cultures isolated from animal biomaterial and environmental samples, with bacteriological, molecular biological, and molecular genetic identification
S. V. Ionina, E. I. Gordeeva

ORIGINAL ARTICLES | BIOTECHNOLOGY

- 303** Approaches to determining the genetic sequence of RNA viruses from low-copy biological material, using bat viruses as a model
K. A. Stolbunova, M. A. Stepanyuk, A. D. Moshkin, I. V. Popov, O. V. Ohlopko

Дорогие авторы статей, читатели, рецензенты и члены редакционной коллегии журнала «Ветеринария сегодня»!

21 июля 2026 года экспертным советом Scopus принято решение о включении научного журнала «Ветеринария сегодня», издаваемого федеральным государственным бюджетным учреждением «Федеральный центр охраны здоровья животных» (Россельхознадзор), в международную базу данных Scopus, что является значимым событием для журнала и его авторов.

Индексация в одной из ведущих международных наукометрических баз данных подтверждает высокий уровень научного издания, способствует повышению его международной узнаваемости и расширяет возможности продвижения результатов российских исследований в мировом научном сообществе.

Этого удалось достичь благодаря кропотливой работе редакционной команды под руководством главного редактора Груздева Константина Николаевича, доктора биологических наук, а также авторов и рецензентов – ведущих специалистов в области ветеринарии.

Журнал ориентирован на ученых, занимающихся фундаментальными и прикладными исследованиями в области общей и ветеринарной вирусологии, эпизоотологии, иммунологии, микологии, микотоксикологии, бактериологии, практикующих ветеринарных врачей и врачей ветеринарных лабораторий и государственных ветеринарных служб, преподавателей вузов ветеринарной, биологической, медицинской направленностей, аспирантов и студентов вузов и колледжей.

«Ветеринария сегодня» издается ФГБУ «ВНИИЗЖ» с 2012 года, а с 2015-го все материалы журнала находятся в открытом доступе на русском и английском языках.

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК по научным специальностям «Вирусология» и «Инфекционные болезни и иммунология животных», представлен в РИНЦ (Российский индекс научного цитирования), базе данных RSCI, а также индексируется в международных базах DOAJ, AGRIS, EBSCOhost, Scilit, OpenAlex, CNKI и других.



Благодарю всех за высокий профессионализм в деле служения ветеринарии и выражаю глубокую признательность за ваш вклад в развитие журнала «Ветеринария сегодня».

С уважением,
директор ФГБУ «ВНИИЗЖ»
Хасан Муштафеевич Лихов

Поздравление с Днем ветеринарного работника!

Дорогие коллеги, поздравляю вас с профессиональным праздником – Днем ветеринарного работника!

Ветеринария – одна из самых гуманных и благородных отраслей науки, незаменимая для всех сфер жизни. От состояния дел в ветеринарии непосредственно зависит экономический суверенитет страны, благосостояние ее граждан, здоровье нации, благополучие нынешнего и будущего поколений.

Профессия ветеринара объединяет многих – врачей-практиков, работников лабораторий, служащих органов исполнительной власти, ученых и предпринимателей. На эту стезю приводит призвание, и случайных людей здесь не бывает.

Своим ежедневным трудом ветеринарные специалисты способствуют обеспечению продовольственной и биологической безопасности страны, сохранению здоровья сельскохозяйственных, диких и домашних животных, а значит, и здоровья людей.

Ваша профессия, бесценные знания и накопленный опыт являются жизненно необходимыми для агропромышленной отрасли.

Все эти достижения были бы невозможны без слаженной и высокопрофессиональной работы. Специалисты несут нелегкую службу в лабораториях и участковых ветеринарных пунктах, ветеринарных объединениях, в комплексах по производству животноводческой продукции и на предприятиях по изготовлению кормов и лекарственных препаратов.

Сегодня работа всего ветеринарного сообщества позволяет достигать уверенных темпов импортозамещения продукции, разрабатывать уникальные вакцины и диагностические методики, совершенствовать научно-исследовательскую работу – все это дает нам возможность уверенно двигаться вперед.



От всей души поздравляю всех, кто отдает свои силы, жертвует своим временем на благо здоровья и благополучия человека и животных. Пусть ваш труд приносит окружающим людям уверенность в завтрашнем дне и надежды на светлое будущее!

С уважением,
заместитель директора ФГБУ «ВНИИЗЖ»,
директор Всероссийского научного исследовательского
института здоровья животных
Руслан Петрович Коберник



<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-216-225>
УДК 619:578.824.9:636.2(048)



Эпизоотическая геморрагическая болезнь жвачных: современные знания (обзор)

Т. Ю. Беспалова, Т. В. Михалева

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» (ФГБНУ ФИЦВиМ); Самарский научно-исследовательский ветеринарный институт – филиал ФГБНУ ФИЦВиМ (СамНИВИ – филиал ФГБНУ ФИЦВиМ), ул. Магнитогорская, 8, г. Самара, 443013, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Эпизоотическая геморрагическая болезнь – это трансмиссивное инфекционное неконтагиозное заболевание диких и домашних жвачных животных, проявляющееся застойными и геморрагическими явлениями. Возбудитель – вирус из рода *Orbivirus* семейства *Sedoreoviridae*, который передается между восприимчивыми животными через укусы членистоногих переносчиков рода *Culicoides*. За последние 20 лет возбудитель эпизоотической геморрагической болезни распространился в новые регионы, с 2022 г. на территории Южной Европы стали регистрировать массовые вспышки заболевания среди крупного рогатого скота, что создало серьезную угрозу для отрасли животноводства.

Цель исследования. Обобщение и анализ современных опубликованных данных о глобальной ситуации по эпизоотической геморрагической болезни.

Материалы и методы. Применялись аналитические методы исследований с использованием баз данных PubMed, Wiley Online Library, MDPI, Google Scholar, eLibrary, КиберЛенинка.

Результаты. Приведена краткая характеристика возбудителя заболевания. К настоящему времени в мире идентифицировано семь серотипов вируса эпизоотической геморрагической болезни, а недавно сообщалось о новом серотипе 10. Наблюдается глобальное географическое распространение вируса эпизоотической геморрагической болезни на всех континентах с региональными особенностями распределения серотипов. Серотипы 1, 2, 6, 7, 8, 10 обладают повышенной патогенностью и вызывают вспышки эпизоотической геморрагической болезни среди оленей и крупного рогатого скота. В обзоре кратко обсуждаются факторы, способствующие распространению вируса эпизоотической геморрагической болезни на новые территории, описаны клинические признаки заболевания у восприимчивых животных, определены основные меры профилактики и контроля для снижения риска возникновения вспышек болезни и обозначены пробелы в исследованиях.

Заключение. Способность вируса эпизоотической геморрагической болезни к рекомбинации, появление высоковирулентных штаммов, прогрессирующее расширение ареала активности переносчиков могут привести к крупным вспышкам со значительными экономическими потерями в животноводческом секторе, включая страны Европы и Азии. В современных условиях необходимо усилить энтомологический и вирусологический надзор для раннего выявления вируса эпизоотической геморрагической болезни среди жвачных животных и контроля за его распространением.

Ключевые слова: обзор, ЭГБ, вирус эпизоотической геморрагической болезни, жвачные животные, переносчики, *Culicoides*

Благодарности: Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания ФГБНУ ФИЦВиМ (тема № FGNM-2026-0004). Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку данной работы и Д. А. Лунину за визуализацию полученных данных.

Для цитирования: Беспалова Т. Ю., Михалева Т. В. Эпизоотическая геморрагическая болезнь жвачных: современные знания (обзор). *Ветеринария сегодня*. 2026; 15 (3): 216–225. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-216-225>

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Беспалова Татьяна Юрьевна, начальник группы, СамНИВИ – филиал ФГБНУ ФИЦВиМ, ул. Магнитогорская, 8, г. Самара, 443013, Россия, 27bt@mail.ru

Epizootic hemorrhagic disease of ruminants: current knowledge (review)

Tatiana Yu. Beshpalova, Tatyana V. Mikhaleva

Federal Research Center for Virology and Microbiology; Samara Research Veterinary Institute – Branch of Federal Research Center for Virology and Microbiology, ul. Magnitogorskaya, 8, Samara 443013, Russia

ABSTRACT

Introduction. Epizootic hemorrhagic disease (EHD) is a vector-borne, infectious, non-contagious disease affecting wild and domestic ruminants, characterized by congestive and hemorrhagic manifestations. The causative agent is a virus of the genus *Orbivirus* family *Sedoreoviridae*, which is transmitted between susceptible animals through the bites of *Culicoides* midges. Over the past 20 years, epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV) has spread to new regions. Since 2022, large-scale outbreaks among cattle have been reported in Southern Europe, posing a serious threat to the livestock industry.

Objective. To summarize and analyze current published data on the global situation regarding EHD.

Materials and methods. Analytical research methods were employed using the following databases: PubMed, Wiley Online Library, MDPI, Google Scholar, eLibrary, and CyberLeninka.

Results. A brief description of the disease's causative agent is provided. To date, seven serotypes of EHDV have been identified worldwide, with a novel serotype 10 recently reported. A global geographical spread of EHDV across all continents is observed, with regional variations in serotype distribution. Serotypes 1, 2, 6, 7, 8, and 10 exhibit increased pathogenicity, causing EHD outbreaks in deer and cattle. This review briefly discusses the factors contributing to the spread of EHDV to new territories. It also describes clinical signs of EHD in susceptible animals, outlines key prevention and control measures to reduce the risk of new outbreaks, and identifies current research gaps.

Conclusion. The ability of EHDV to undergo recombination, the emergence of highly virulent strains, and the progressive expansion of vector ranges may lead to large-scale outbreaks with significant economic losses in the livestock sector, including European and Asian countries. In current conditions, it is necessary to enhance entomological and virological surveillance for the early detection and control of EHDV spread among ruminants.

Keywords: review, EHD, epizootic hemorrhagic disease virus, EHDV, ruminants, vectors, *Culicoides*

Acknowledgements: The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the state assignment for the Federal Research Center for Virology and Microbiology (No. FGNM-2026-0004). The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this paper and Daria Lunina for the visualization of the data obtained.

For citation: Bespalova T. Yu., Mikhaleva T. V. Epizootic hemorrhagic disease of ruminants: current knowledge (review). *Veterinary Science Today*. 2026; 15 (3): 216–225. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-216-225>

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

For correspondence: Tatiana Yu. Bespalova, Head of Group, Samara Research Veterinary Institute – Branch of Federal Research Center for Virology and Microbiology, ul. Magnitogorskaya, 8, Samara 443013, Russia, 27bt@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Эпизоотическая геморрагическая болезнь (ЭГБ, EHD) – трансмиссивное инфекционное неконтагиозное вирусное заболевание диких и домашних жвачных животных, преимущественно оленей и крупного рогатого скота. Возбудителем ЭГБ является РНК-содержащий вирус (EHDV) из рода *Orbivirus* семейства *Sedoreoviridae*, таксономически и иммунологически близкий к вирусу блютанга (BTV), который передается между восприимчивыми животными через укусы мокрецов рода *Culicoides* [1]. ЭГБ включена в список многовидовых/трансграничных заболеваний, с 2008 г. подлежит уведомлению во Всемирную организацию здравоохранения животных (ВОЗЖ, WOAH), не является зоонозом.

Болезнь исторически регистрируют преимущественно в тропических и субтропических зонах на разных континентах, включая Северную и Южную Америку, Африку, Ближний Восток, Азию, Австралию и Океанию. Однако за последние 20 лет EHDV стал распространяться за пределы традиционных эндемичных нозоареалов в новые, более северные регионы. С конца 2022 г. «экзотическую» болезнь регистрировали на территории Южной Европы, массовые вспышки ЭГБ создали серьезную угрозу для здоровья жвачных животных, в связи с чем возросло количество современных исследований по проблемам эмерджентных инфекций. В частности, по теме ЭГБ обновляются эпизоотологические, филогенетические и клинические данные, особенно касающиеся заболевания крупного рогатого скота. Отмечается появление штаммов возбудителя с повышенной вирулентностью, что приводит к тяжелому течению ЭГБ не только у оленей, но и у крупного рогатого скота, из-за чего возникают значительные потери продуктивности, особенно в молочном производстве. Спорадические эпизоотии ЭГБ могут нанести экономический ущерб оленеводческим хозяйствам. В дикой природе потери от заболевания могут иметь долгосрочные последствия для биоразнообразия и сохранения численности популяции жвачных животных, в первую очередь оленей [2, 3, 4, 5, 6].

Установлено, что глобальному перераспределению EHDV в последние годы способствует ряд экоклиматических, генетических и антропогенных факторов, таких как изменение климата, приводящее к расширению ареала и увеличению численности переносчиков рода *Culicoides*, реассортация вирусных штаммов, международная торговля животными и др. [4, 7].

В связи с вышеизложенным обобщение современных знаний и изучение тенденций распространения ЭГБ актуальны для специалистов в области ветеринарии и животноводства в плане обеспечения благополучия животных, а также предотвращения возможного ущерба в дикой природе.

ВОЗБУДИТЕЛЬ ЭГБ И ВОСПРИИМЧИВЫЕ ЖИВОТНЫЕ

Вирус EHDV относится к арбовирусам (род *Orbivirus*, семейство *Sedoreoviridae*) и тесно связан с BTV. Он имеет непокрытый оболочкой двойной капсид и геном двухцепочечной РНК, состоящий из 10 сегментов. Геном кодирует 7 структурных белков (VP1–VP7), 4 неструктурных белка NS1, NS2, NS3/NS3A, NS4 и предполагаемый NS5. Вирусная частица состоит из 3 белковых слоев (рис. 1). Внешний капсид включает два белка, VP2 и VP5. Промежуточный слой состоит из VP7 и VP3. Внутренний капсид содержит комплекс РНК-полимеразы, состоящий из белков VP1, VP4 и VP6. Вследствие изменчивости отдельных белков внешней мембраны EHDV классифицируют по отдельным генотипам. Наиболее вариабельными являются сегменты Seg-2 и Seg-6, кодирующие VP2 и VP5 соответственно. Белок VP7 содержит серогруппоспецифические антигены, а белки VP2 (S2) и VP5 (S6) вызывают выработку серотип-специфичных нейтрализующих антител, поэтому они используются для определения серотипа вируса¹ [3, 8].

¹ WOAH. Epizootic haemorrhagic disease. <https://www.woah.org/en/disease/epizootic-haemorrhagic-disease>

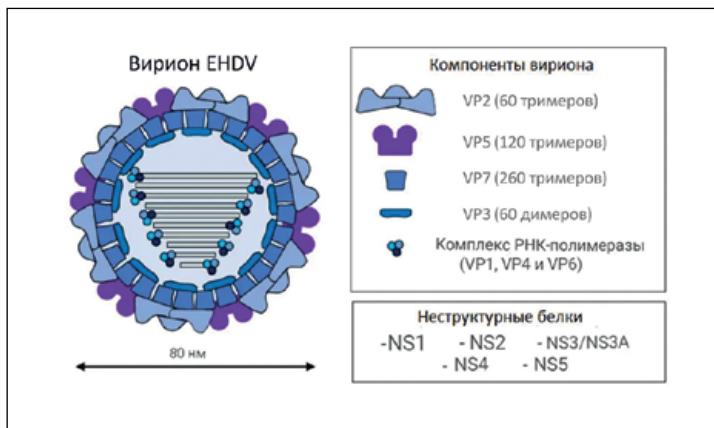


Рис. 1. Схема строения вирусной частицы EHDV [3]

Fig. 1. Diagram of the EHDV virion structure [3]

Исторически на основе серологической реактивности было выделено в общей сложности 8 серотипов EHDV (1986 г.). Примечательно, что EHDV-3 (нигерийский штамм NIG1967/01) фактически оказался серотипом 1, и позднее был объединен с EHDV-1. К настоящему времени в мире идентифицировано семь серотипов EHDV (EHDV-1, EHDV-2, EHDV-4–8), продолжается выявление новых серотипов, поэтому пока нет общепринятого мнения относительно точного их числа серотипов и панель референсных штаммов EHDV еще официально не признана. Сравнительно недавно появились сведения о новом серотипе, предварительно названном EHDV-10 (впервые выделен в Японии в 1998 г.), в 2017 г. в Японии в крови крупного рогатого скота был обнаружен новый штамм ON-4/B/98 серотипа 10, а в 2018 г. в Китае EHDV-10 был выделен из мокрецов *Culicoides tainanus*, при этом у местного крупного рогатого скота и коз выявляли нейтрализующие EHDV-10 антитела² [4, 8, 9, 10, 11].

Вирусом EHDV могут заражаться различные виды жвачных животных, в первую очередь из семейств *Cervidae* и *Bovidae*. Среди диких наиболее восприимчивы североамериканский белохвостый олень (*Odocoileus virginianus*), чернохвостый олень (*Odocoileus hemionus*) и американская вилорогая антилопа (*Antilocapra americana*). Сообщалось о естественном заболевании благородного оленя (*Cervus elaphus*), снежного барана (*Ovis canadensis*), американского бизона (*Bison bison*), яка (*Bos grunniens*), северного оленя (*Rangifer tarandus*), скалистого горного козла (*Oreamnos americanus*), антилопы (*Antilopinae*), лося (*Alces alces*) и др. Экспериментально воспроизводили субклиническую форму заболевания, обусловленного EHDV-1, у благородного оленя, косули (*Capreolus capreolus*), лани (*Dama dama*) и мунтжака (*Muntiacus muntjak*). Среди домашних жвачных к ЭГБ могут быть восприимчивы коровы, буйволы, козы, овцы и верблюды. Восприимчивость других видов животных мало изучена² [1, 12].

ГЕОГРАФИЧЕСКОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СЕРОТИПОВ ВИРУСА ЭГБ

Первые случаи ЭГБ были зарегистрированы на юго-востоке США в конце XIX в. (1890 г.), где изначально это заболевание называли «болезнью черного языка». Нозологически болезнь была определена в 1955 г.,

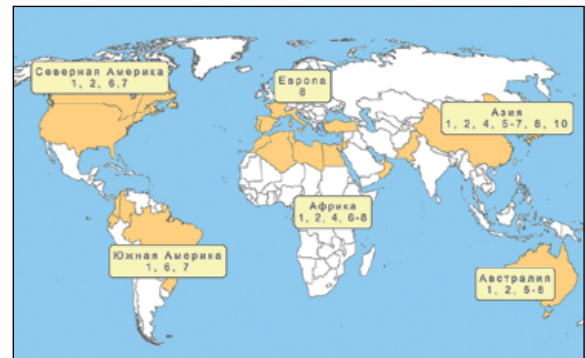


Рис. 2. Географическое распределение серотипов EHDV (2000–2025 гг.)

Fig. 2. Geographic distribution of EHDV serotypes (2000–2025)

когда в США (штат Нью-Джерси) среди популяции белохвостых оленей было зарегистрировано несколько сотен смертельных случаев, возбудитель позднее был классифицирован как EHDV-1. Затем в 1962 г. в Канаде был выделен вирус второго серотипа, получившего название EHDV-2 [2, 6, 11]. В современном мире наблюдается глобальное географическое распространение серотипов вируса ЭГБ, которые циркулируют в субтропическом и тропическом климате Америки, Африки, Азии, Ближнего Востока и Океании. В Австралии и ряде стран Азии и Африки ЭГБ является эндемичной, но Северная Америка – единственный континент, где эпизоотии ЭГБ происходят циклично и систематически, сопровождаются высокой смертностью диких оленей, при этом во время крупномасштабных вспышек среди оленей часто одновременно поступают сообщения о заболевании крупного рогатого скота [3, 12].

Литературные данные свидетельствуют о том, что распределение различных серотипов EHDV по всему миру имеет выраженные региональные особенности (рис. 2). В США и Канаде преобладают вирусы серотипов 1, 2, 6 и 7, в Бразилии – серотипа 1, тогда как в Северной Африке циркулируют вирусы серотипов 1, 2, 4, 6–8, в Израиле – серотипов 1, 2, 6 и 7, в Иордании и Турции – 1, 6, 7, в Пакистане, а также в Австралии – серотипов 1, 2, 5–8 [3, 7, 13, 14, 15]. Наибольшая гетерогенность выявлена в Азии (Япония, Китай, Тайвань, Южная Корея), в частности, в Японии регистрировали вирусы всех серотипов, в Китае – серотипов 1, 2, 5, 6, 7, 8. EHDV серотипа 10 циркулирует в Японии и в естественных очагах на юге Бразилии [8, 11, 16]. Ретроспективный анализ данных обнаружения EHDV в разных странах показал, что в последние два десятилетия практически не регистрируют вирусы серотипов 4 и 5, ранее они были связаны с Азией, Африкой и Австралией. В ряде стран (Индонезия, Зимбабве, Кения, Казахстан, Китай и др.) обнаружение генома или серологические данные указывают на циркуляцию EHDV неизвестных серотипов [1, 3, 4].

С момента выявления EHDV в середине XX в. наиболее патогенным из известных серотипов считался EHDV-2 (вирус Ибараки), который в первую очередь поражал американских белохвостых оленей, а также вызывал спорадические или массовые вспышки среди крупного рогатого скота в США, Канаде, Японии, Австралии, некоторых странах Африки [4, 17, 18, 19]. Поскольку вирус эволюционирует, в современном

² WOAH. Epizootic haemorrhagic disease.
<https://www.woah.org/en/disease/epizootic-haemorrhagic-disease>

мире отмечается повышенная патогенность и других серотипов, вследствие чего эпизоотии ЭГБ стали более частыми, опасными и масштабными. Так, с участием вируса серотипов 1, 6 или 7 были зарегистрированы многочисленные вспышки в различных странах: Марокко, Алжир и Иордания (2006 г.), Турция (2007 г.), Тунис, Израиль (2006, 2015, 2016, 2020 гг.), США и Китай (2012, 2013, 2021 гг.), Бразилия (2025 г.). В Японии тяжелое заболевание у крупного рогатого скота вызвал вирус серотипов 7 и 10, в Северной Африке и Европе – серотипа 8 (2022–2024 гг.) [3, 8, 13, 14, 20, 21, 22, 23, 24].

В настоящее время EHDV-8 является единственным серотипом, выявленным в Европе во время масштабных вспышек ЭГБ среди крупного рогатого скота и благородных оленей в 2022–2024 гг. До этого периода Европейский континент был свободен от вируса ЭГБ, за исключением случаев выявления EHDV-6 в 2003 и 2009 гг. на острове Реюньон (Франция). В октябре 2022 г. возбудитель ЭГБ был впервые обнаружен у оленей на о. Сардиния (Италия), где затем последовала вспышка среди крупного рогатого скота, также ЭГБ регистрировали на о. Сицилия. Предположительно, вирус попал в Европу при перемещении насекомых-переносчиков с пустынными ветрами из региона Магриб Северной Африки (северные части Туниса, Алжира и Марокко). Близость итальянских островов к Тунису (180 и 140 км соответственно) указывала на потенциальный путь проникновения вируса через переносчиков. Третьей европейской территорией, где была зарегистрирована вспышка ЭГБ среди крупного рогатого скота, была Андалусия (Испания), расположенная всего в нескольких километрах от Марокко, по другую сторону Гибралтарского пролива. К 2023 г. вирус распространился на север Пиренейского полуострова и на юго-запад Франции. При этом зимой 2023–2024 гг. наблюдали прекращение циркуляции вируса, что, скорее всего, было связано со снижением численности и активности переносчиков рода *Culicoides* и увеличением инкубационного периода при более низких температурах. Летом 2024 г. в Испании, Португалии и Франции вновь выявляли ЭГБ, например, к концу 2024 г. во Франции среди крупного рогатого скота было зарегистрировано свыше 4000 вспышек, вызванных EHDV-8. В 2025 г. в ВОЗЖ сообщения о ЭГБ поступали из Франции (май) и Андорры (июнь)³ [4, 5, 25, 26, 27, 28]. Интересно, что серотип 8 стал причиной первой крупной циркуляции EHDV в Северной Африке (более 200 вспышек) и по времени совпал с аналогичными вспышками на юге Европы. Филогенетическими исследованиями было доказано трансконтинентальное распространение EHDV-8 между этими странами и Южной Европой, гомология европейских штаммов со штаммами EHDV-8, обнаруженными в Тунисе в 2021 и 2022 гг., составила более чем 99,9%. Текущие данные свидетельствуют о том, что причиной тяжелых вспышек могла стать реассортация местных африканских штаммов [5, 6]. По сообщениям, с помощью полногеномного секвенирования и филогенетического анализа последовательностей выявлены множественные случаи реассортации между серотипами 1–6, 6–8 и 2–7. Поскольку в эндемичных странах ЭГБ часто протекает бессимптомно у домашнего скота, эти случаи могут

оставаться незамеченными [3, 5, 6]. Субклиническая инфекция усложняет диагностику и борьбу с заболеванием, поскольку инфицированные носители способствуют трансграничному распространению вируса. Дикie жвачные животные являются резервуарами для вируса ЭГБ, поддерживая его естественную циркуляцию в природных очагах, и играют ключевую роль в распространении трансмиссивных инфекций среди домашнего скота [2, 4].

ПЕРЕНОСЧИКИ, ФАКТОРЫ РИСКА РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВИРУСА ЭГБ

Возникновение и распространение ЭГБ зависит от компетентных насекомых-переносчиков (векторов), их географического обитания и климатических факторов. Согласно сообщениям о случаях регистрации ЭГБ, диапазон циркуляции вируса лежит приблизительно между 35° южной широты и 49° северной широты, включая эндемичные территории в Северной Америке, Австралии, Азии и Африке. Современные исследования показывают изменения географического нозоареала обитания переносчиков и расширение их видового диапазона. Основными векторами или потенциальными носителями EHDV являются кровососущие мокрецы рода *Culicoides* семейства *Ceratopogonidae* (отряд *Diptera*). В распространении возбудителя ЭГБ из тысячи известных видов мокрецов наибольшее значение имеют *C. obsoletus*, *C. actoni*, *C. brevitarsis*, *C. imicola*, *C. oxystoma*, *C. tainanus*, *C. scoticus*, *C. sonorensis*, *C. punctatus*, *C. stellifer* и *C. venustus*. При этом в разных регионах доминируют определенные виды, у которых различаются циклы развития, поведение и периоды активности. Следует отметить, что *C. imicola*, *C. obsoletus*, *C. scoticus* также являются основными переносчиками BTV в Европе, *C. imicola* – в Африке, *C. sonorensis* – в Северной Америке, *C. brevitarsis* – в Азии, Австралии и Индонезии [4, 9, 11, 29, 30, 31]. Климатические и погодные переменные (температура, влажность, ветер) сильно влияют на жизненный цикл и ареал обитания *Culicoides* spp. и, следовательно, на динамику вспышек ЭГБ [32]. Как и другие трансмиссивные заболевания, ЭГБ-инфекции, как правило, сезонны и возникают в период активности переносчиков, который зависит от географической приуроченности, численности популяции и цикла развития конкретного вида мокрецов. Обычно это летний период, длящийся до поздней осени с пиками в конце лета и начале осени, особенно часто ЭГБ отмечают в низменных, влажных районах эндемичных территорий. В тропических странах местный домашний крупный рогатый скот и козы из-за укусов мокрецов могут заражаться круглогодично [11].

Способность членистоногих передавать любой вирус зависит от температуры окружающей среды, при более высоких температурах (> 20 °C по сравнению с 15 °C) уровень заражения возрастает [3]. Повышение температуры и изменение климата могут повлиять на вирусный геном, способствуя рекомбинации и появлению новых вирусных мутаций [33]. Глобальное потепление является основной причиной вспышек ЭГБ, изменяя распространение, поведение и численность насекомых-переносчиков. С 1982 г. темпы потепления превышают 0,2 °C за десятилетие. Так, 10 лет с 2015 по 2024 г. были самыми теплыми. Начиная с 1850 г. самым теплым в мире стал 2024 г.: средняя глобальная температура была на 1,29 °C выше среднего значения

³ <https://wahis.woah.org/#/event-management>

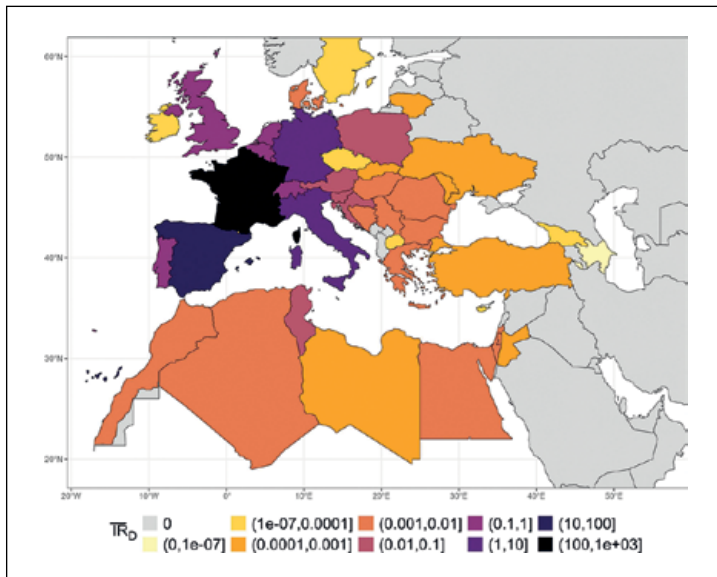


Рис. 3. Пространственное распределение $\bar{IR}_D$ – среднесеasonного риска заражения EHDV-8 в странах Европы, Северной Африки, Израиле и Палестине (D). При оценке риска заражения учитывались как ветровой, так и торговый пути для страны D [37]

Fig. 3. Spatial distribution of $\bar{IR}_D$, the mean monthly risk of EHDV-8 introduction per country in Europe, North Africa, Israel, and Palestine (D). The risk assessment considers both the wind and trade pathways cumulatively for country D [37]

в XX в. (13,9 °C)⁴. По мнению исследователей, потепление может увеличить инфекционный потенциал векторов за счет ускорения множества процессов, включая более высокую частоту укусов и откладывания яиц, более быстрое размножение вирусов и более короткий внешний инкубационный период. Мягкие зимы и продолжительный теплый сезон создают благоприятные условия для развития неполовозрелых особей, выживаемости и увеличения срока жизни взрослых особей, их размножения, увеличения продолжительности периода передачи патогена (более раннее весеннее начало и более поздняя осенняя передача). Например, вспышки в Европе регистрировали как в мае, так и в ноябре⁵ [4, 6, 34]. Помимо температуры, на выживаемость и размножение переносчиков неоднородное влияние оказывают влажность, сезонные осадки и засуха. Муссонные дожди и орошение полей расширяют среду обитания личинок, увеличивают продолжительность жизни взрослых особей за счет более высокой влажности и дают время для инкубации и размножения внутри переносчика, но очень интенсивные или продолжительные осадки и короткие сильные ливни могут вымывать личинки или повреждать среду обитания насекомых, приводя к обратным явлениям. В период засухи животные-носители концентрируются около скудных источников воды, привлекая переносчиков, а сухие ветры способствуют перемещению насекомых [35]. Передача через ветер является основным путем распространения инфекций, переносимых насекомыми, при этом имеет значение скорость

и направление ветра. Мокрецы могут самостоятельно преодолевать до 5 км или могут пассивно переноситься ветровыми потоками на большие расстояния (более 100 км), особенно по водоемам, что способствует быстрому распространению вируса [4, 36]. Кроме того, существует потенциальный риск передачи EHDV при легальной и нелегальной торговле зараженным скотом, как свидетельствуют случаи инфицирования телят EHDV-8 и BTV, которых импортировали в Израиль из Португалии в 2023 г. [13].

В недавнем исследовании A. Bibard et al. (2025) моделирование рисков распространения EHDV, связанных с ветром и торговлей, выявило широкую, но неоднородную зону риска в 42 европейских странах, при этом Юго-Западная Европа была определена как зона повышенного риска. В отличие от ветрового пути вклад торгового пути в общий уровень риска был оценен как низкий, что могло быть связано со строгими мерами контроля в отношении трансграничной торговли животными или с относительно небольшим количеством животных, экспортируемых из стран-источников. Страна, которая показала более высокие оценки риска из-за ветра, были Франция, Испания, Италия и Германия, за ними следуют Бельгия, Швейцария, Португалия, Великобритания, Люксембург и Нидерланды (рис. 3). Самым низким был уровень риска в странах Восточной Европы и Швеции. Самый высокий уровень риска, связанный с торговым путем, был у Италии и Испании. Интересно, что Италия способствовала возникновению торговых рисков в целом ряде стран, Испания – в странах Восточной Европы, таких как Хорватия и Словения, а Португалия создавала риски в отдаленных странах, таких как Израиль и Палестина [37].

В исследовании S. Gubbins (2024) расчет базового коэффициента воспроизводства (R_0) для количественной оценки передачи EHDV в Европе показал, что, в зависимости от штамма, максимальный R_0 для вируса варьирует от 0,7 до 2,5 у крупного рогатого скота и от 1,3 до 4,3 у оленей. Максимальное значение R_0 наблюдали при температуре от 22 до 25 °C, а самая низкая температура, при которой R_0 превышал единицу, составляла от 16 до 20 °C. Превышение единицы R_0 при температурах, характерных для большей части Европы, указывает на потенциальную возможность EHDV вызывать вспышки [38].

В России, стране с развитым домашним оленеводством, с эпизоотологической точки зрения, вероятно, следует учитывать восприимчивость оленей к EHDV и близость территорий ареала обитания к границам стран, неблагополучных в отношении трансмиссивных заболеваний. По данным ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр развития охотничьего хозяйства», а также по сообщениям исследователей, в последние годы отмечается рост численности дикого северного оленя (ареал обитания охватывает территории Сибирского и Дальневосточного федеральных округов, Таймырского, Кольского полуостровов, от Карелии до Охотского побережья), благородного оленя (ареал обитания: Сибирский и Дальневосточный, Центральный, Южный и Северо-Кавказский федеральные округа), пятнистого оленя (*Cervus nippon*; около 60% от общей численности обитает в охотугодьях Приморского края), который также был успешно акклиматизирован в субъектах Центрального, Приволжского, Северо-Кавказского

⁴ Climate.gov Climate Change: Global Temperature. <https://www.climate.gov/news-features/understanding-climate/climate-change-global-temperature>

⁵ <https://wahis.waoh.org/#/event-management>



Рис. 4. Сильно истощенный олень, переживший острую стадию ЭГБ
(фото: Chris Cook, Alabama Department of Conservation and Natural Resources) [12]

Fig. 4. A severely emaciated deer after surviving the acute stage of EHD (photo by Chris Cook, Alabama Department of Conservation and Natural Resources) [12]



Рис. 5. Хроническая инфекция ЭГБ. Обширные язвы на коже в области коленей и грудины у белохвостого оленя
(фото: Bambi Clemons, Florida Fish and Wildlife Conservation Commission) [12]

Fig. 5. Chronic EHD. Extensive skin ulcers in the knee and sternal regions of a white-tailed deer (photo by Bambi Clemons, Florida Fish and Wildlife Conservation Commission) [12]

и Южного федеральных округов⁶ [39, 40]. При этом ареал обитания домашних оленей может совпадать с ареалом обитания диких оленей. К примеру, самая многочисленная ненецкая порода северного оленя выпасается на территории как европейской, так и азиатской части России, превышающей 100 млн га. Ареал обитания эвенкийской породы домашнего северного оленя охватывает территорию Красноярского края, Тувы, Бурятии, Якутии (левобережье Лены и южные районы), Хабаровского края, Иркутской, Читинской, Амурской, Сахалинской областей [41]. Что касается переносчиков EHDV, то стоит учитывать практически повсеместное распространение мокрецов рода *Culicoides* в различных ландшафтно-климатических и географических зонах России с наибольшей их численностью в Сибири и на Дальнем Востоке и доминированием следующих видов: *C. obsoletus*, *C. pulicaris*, *C. punctatus*, *C. chiopterus* и др. В настоящее время систематическое изучение ареалов и плотности популяции основных переносчиков на территории Российской Федерации проводится в недостаточных объемах, что значительно затрудняет оценку риска заноса и распространения трансмиссивных инфекций [42].

КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ЭГБ

Циркуляция EHDV в стадах крупного рогатого скота, вероятно, способствует естественной иммунизации большого количества животных. Однако о клеточном иммунном ответе, вызываемом возбудителем ЭГБ, известно немного. Некоторые результаты показывают, что клеточно-опосредованный иммунный ответ формируется уже на 5–7-й день после заражения, но затем быстро ослабевает [43]. В разных странах изучается серопревалентность стад крупного рогатого скота, буйволов, овец и коз, значения которой варьируют в зависимости от географического региона, вида и возраста животного, серотипа и др. [11, 15, 16, 24, 44, 45]. Тяжесть заболевания и симптомы, наблюдаемые у больных животных, сильно

различаются и могут зависеть от вирулентности штамма, вида хозяина и иммунологических факторов⁷.

У оленей течение ЭГБ варьируется от молниеносной формы до бессимптомной. Классической формой считается острая, которая характеризуется лихорадкой, вялостью, отеком морды и языка, гиперемией слизистых оболочек и кожи, конъюнктивитом. В дальнейшем отмечаются апатия, затрудненное дыхание, выделения из ротовой и носовой полостей (чаще пенистые), поражения полости рта, выпадение языка, кровоизлияния, кровавый понос, бурситы, хромота, положение лежа, нежелание двигаться, отсутствие страха на последних стадиях и предсмертные судороги. Смерть может быть молниеносной, без клинических признаков, в течение 8–36 ч, гибель животных с острой формой обычно наступает на 4–15-й день после заражения. У белохвостых оленей в период вспышек смертность носит массовый характер, достигая 70–90%. В конце лета и начале осени во время острой лихорадочной стадии больных оленей часто находят вблизи водоемов (местах обитания переносчиков), многие умирающие животные тонут в воде [7, 12, 46, 47]. У особей, переживших острую форму заболевания, через несколько недель или месяцев могут развиваться хронические поражения: хромота, связанная с трещинами или отслоением копыт, затрудненное и болезненное пережевывание или глотание, впоследствии сильное истощение и смерть от голода или вторичной бактериальной инфекции (рис. 4). При тяжелом хроническом течении заболевания олени вынужденно передвигаются на коленях, что приводит к образованию глубоких язв на коже конечностей и грудины (рис. 5) [1, 12].

У крупного рогатого скота в эндемичных странах в большинстве случаев ЭГБ протекает бессимптомно (до 90%) или с легкими, реже тяжелыми клиническими проявлениями, которые регистрировали в Средиземноморском бассейне, Японии, на острове Реюньон, в Южной Африке и США. В новых регионах (особенно в Европе) EHDV вызывает не только субклинические

⁶ <http://www.ohotcontrol.ru/resource/number>

⁷ WOAH. Epizootic haemorrhagic disease. <https://www.woah.org/en/disease/epizootic-haemorrhagic-disease>



Рис. 6. Обширные эрозии и язвы на сосках у коровы во время вспышки ЭГБ, вызванной вирусом серотипа 7, в 2006 г. в Израиле (фото: Dr. Benny Sharir, Hachaklait) [12]

Fig. 6. Cow exhibiting severe teat erosions and ulcers during the 2006 EHDV-7 outbreak in Israel (photo by Dr. Benny Sharir, Hachaklait) [12]



Рис. 7. ЭГБ у крупного рогатого скота: А – эрозии и язвы в ротовой полости, слюнотечение; В – повреждение венечной связки и выпадение копытной капсулы [48]

Fig. 7. EHD in cattle: A – oral erosions and ulcers along with hypersalivation; B – coronary band injury and sloughing of the hoof capsule [48]

формы, в большинстве хозяйств отмечались более тяжелые, острые формы с высокой заболеваемостью и смертельными случаями. По сообщениям, уровень заболеваемости среди взрослого поголовья крупного рогатого скота сильно варьирует и составляет от 1,8 до 20%, реже до 100%, в зависимости от размера стада. Результаты исследований показывают, что одним из факторов риска возникновения тяжелой формы ЭГБ является возраст: более восприимчивы коровы старше двух лет. У телят клинические признаки возникают реже, возможно, это связано с предпочтениями переносчиков, меньшей восприимчивостью молодняка к вирусу или факторами окружающей среды, в том числе с методами содержания [4, 48]. Основные

наблюдаемые клинические признаки у коров схожи с таковыми у оленей, наиболее распространенными считаются проблемы с ротовой полостью и копытами. У коров с тяжелыми симптомами отмечают застойные и геморрагические явления, кровь в фекалиях, наличие везикул, эрозий и язв в ротовой полости, на морде и вымени (рис. 6, 7). У молочного скота на 10–20% снижаются надои (минус 2–16 кг/день в зависимости от тяжести заболевания и стадии лактации). Около половины больных животных (чаще мясных пород) страдают отеками конечностей, у них развиваются тяжелый коронит и ламинит (рис. 7). У инфицированных стельных коров могут быть аборты, пороки развития плода и мертворождение. Уровень смертности от ЭГБ у крупного рогатого скота низкий и, по разным данным, обычно не превышает 1–3%, уровень летальности составляет в среднем от 10 до 23%. Такие факторы, как порода, направление и уровень продуктивности скота, стадия лактации или иммуносупрессия на момент заражения, также могут влиять на течение и исход инфекции, что предстоит оценить в будущих исследованиях [1, 5, 7, 11, 12, 27, 48, 49, 50].

У овец и коз отмечают субклиническую инфекцию ЭГБ. По сообщениям M. Gondard et al. (2024), во время эпизоотии ЭГБ во Франции в 2023 г. у коз заболевание клинически не проявлялось, у овец наблюдали симптомы, но в образцах биоматериала EHDV не был обнаружен [5]. При экспериментальном заражении штаммами EHDV-7 и EHDV-8 у овец наблюдали либо кратковременную виремию, либо отсутствие виремии и клинических признаков. Роль мелких домашних жвачных животных в эпизоотологии болезни, по-видимому, незначительна, однако это предположение требует проведения дополнительных исследований [51, 52]. Стоит отметить, что как у овец, так и у крупного рогатого скота регистрируют случаи коинфицирования EHDV и BTV. Совместная циркуляция вирусов повышает риск геномной реассортации [4, 44]. Поскольку оба возбудителя передаются одними видами переносчиков рода *Culicoides* и вызывают схожие симптомы, это затрудняет диагностику и специфическую профилактику данных заболеваний.

ПРОФИЛАКТИКА ЭГБ

Эффективная профилактика ЭГБ является ключевым фактором для минимизации экономических потерь и сохранения здоровья животных. Меры контроля требуют комплексного подхода, включающего вакцинацию и соблюдение карантинных мероприятий, борьбу с переносчиками, мониторинг эпизоотической ситуации, своевременную диагностику и идентификацию циркулирующих штаммов возбудителя. Противовирусное лечение ЭГБ не разработано, специфическая профилактика проводится ограниченно. Основными производителями вакцин против ЭГБ в настоящее время являются Япония и США. В Японии используют моновалентную живую аттенуированную вакцину (EHDV-2) для крупного рогатого скота и инактивированную бивалентную вакцину (EHDV-2 и вирус эфемерной лихорадки крупного рогатого скота). В США для оленей применяют инактивированную рекомбинантную (EHDV-2, -6), а также аутогенную инактивированную вакцины (EHDV-1, -2, -6 и BTV-17) [1, 4, 10, 53, 54, 55]. Кроме этого, в США прошла оценку рекомбинантная субъединичная вакцина на основе белка VP2, которая

при испытании продемонстрировала высокую иммунгенность и защиту, предотвращая как заболевание у белохвостых оленей, так и передачу вируса насекомым-переносчикам [4, 54]. В Европе лицензированные вакцины против ЭГБ пока отсутствуют, живые аттенуированные вакцины использовать не рекомендуется из-за риска распространения вируса переносчиками на новые территории. Однако две вакцины против ЭГБ недавно были одобрены для применения (Делегированный регламент Комиссии (ЕС) 2019/6): инактивированная (vEHNV8-IZSAM) для защиты от EHDV-8 и мультисеротиповая субъединичная MVA-VP7, созданная для защиты от EHDV-8 или EHDV-6 и позволяющая отличать инфицированных животных от вакцинированных (DIVA-стратегия) [1, 4, 43, 53, 56].

Одним из эффективных подходов к ограничению передачи EHDV является борьба с переносчиками. Современные методы контроля сосредоточены на обработке скота инсектицидами для местного применения на животноводческих фермах в периоды высокой активности насекомых, уничтожении или осушении мест их размножения, содержании животных в закрытых и затемненных помещениях. В качестве дополнительной защиты в разных странах применяются мелкоячеистые синтетические сетки, обработанные пиретроидами, световые ультрафиолетовые ловушки [4]. Разрабатываются новые методы борьбы с мокрецами, в частности метод стерильных мошек, использование естественных популяций насекомых, инфицированных *Wolbachia pipientis* [57].

В отличие от достаточно хорошо изученного блютанга в понимании ЭГБ-инфекции все еще есть пробелы, что затрудняет ее контроль. Имеются проблемы, связанные с ограниченностью геномных данных, межконтинентальным распространением вируса и эффективным мониторингом ЭГБ в разных странах, взаимодействием переносчиков, их выживаемостью в условиях текущих климатических изменений, живыми вакцинами и рекомбинантными вакцинами, обеспечивающими перекрестную защиту от нескольких штаммов вируса. Остаются малоизученными некоторые аспекты биологии EHDV, в том числе восприимчивость хозяев и механизмы, лежащие в основе зимовки вируса, роль других восприимчивых хозяев (особенно овец и коз) в циркуляции и передаче возбудителя [6]. Необходимы углубленные исследования с учетом погодных параметров, факторов окружающей среды, состава насекомых-переносчиков, участвующих в новых вспышках ЭГБ, и динамики взаимодействия переносчиков и хозяев [4, 23, 38]. Также будущие исследования должны быть сосредоточены на полногеномном секвенировании вирусных штаммов, чтобы повысить эффективность выявления случаев рекомбинации и уточнить эволюцию патогена. Настоятельно рекомендуется проводить активный мониторинг циркуляции вируса как среди диких, так и домашних жвачных животных, чтобы выявлять новые серотипы и наблюдать за динамикой распространения возбудителя. Устранение пробелов в знаниях необходимо для повышения эффективности стратегий реагирования, включая разработку вакцин, адаптированных к циркулирующим вариантам вируса [28].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время EHDV может вызывать серьезные заболевания как у диких и одомашненных представителей семейства оленевых, так и у крупного рогатого

скота. Наблюдается смена хозяина и течения ЭГБ: тяжелая клиническая форма с высокой заболеваемостью у крупного рогатого скота – вида, который ранее считался менее восприимчивым. Способность EHDV к рекомбинации и появление высокопатогенных штаммов создают угрозы для мирового животноводческого сектора, включая страны Европы и Азии [27, 37]. Географическая приуроченность вируса определенных серотипов больше не является статичной, межконтинентальное перемещение возбудителя приводит к возникновению вспышек в ранее благополучных регионах со значительными экономическими потерями, как это произошло с EHDV-8 в Европе. Прогрессирующее расширение ареала активности насекомых-переносчиков создает риск возникновения ЭГБ на неэндемичных территориях [48]. Потенциал передачи EHDV зависит от ряда факторов. К ним относятся численность и видовое разнообразие *Culicoides* spp., благоприятные климатические условия (температура, количество осадков и влажность) для их размножения и обитания, распространение переносчиков с преобладающими ветрами на длительные расстояния, изменение климата. Важно учитывать, что дикие животные служат резервуарами EHDV и могут передавать инфекцию домашнему скоту через переносчиков. Кроме того, глобальное распространение EHDV возможно при торговле животными, включая бессимптомных носителей, что требует постоянного международного мониторинга. Следовательно, в современных условиях необходимо усилить энтомологический и вирусологический надзор для раннего выявления и контроля за распространением ЭГБ среди жвачных животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. De Souza Santos M. A., Gonzales J. R., Swanenburg M., Vidal G., Evans D., Horigan V., et al. Epizootic hemorrhagic disease (EHD) – systematic literature review report. *EFSA Supporting Publication*. 2023; 20 (11): EN-8027. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2023.EN-8027>
2. Noronha L. E., Cohnstaedt L. W., Richt J. A., Wilson W. C. Perspectives on the changing landscape of epizootic hemorrhagic disease virus control. *Viruses*. 2021; 13 (11):2268. <https://doi.org/10.3390/v13112268>
3. Jiménez-Cabello L., Utrilla-Trigo S., Lorenzo G., Ortego J., Calvo-Pinilla E. Epizootic hemorrhagic disease virus: current knowledge and emerging perspectives. *Microorganisms*. 2023; 11 (5):1339. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051339>
4. Barua S., Rana E. A., Prodhan M. A., Akter S. H., Gogoi-Tiwari J., Sarker S., et al. The global burden of emerging and re-emerging orbiviruses in livestock: an emphasis on bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus. *Viruses*. 2025; 17 (1):20. <https://doi.org/10.3390/v17010020>
5. Gondard M., Postic L., Garin E., Turpaud M., Vorimore F., Ngwa-Mbot D., et al. Exceptional bluetongue virus (BTV) and epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV) circulation in France in 2023. *Virus Research*. 2024; 350:199489. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2024.199489>
6. Arbi M., Harigua-Souiai E., Hanachi M., Larbi I., Chaouh M., Rjaibi D., et al. Emergence and evolution of epizootic hemorrhagic disease virus in the Mediterranean region: spatio-temporal dynamics and epidemiological insights. *Frontiers in Veterinary Science*. 2025; 12:1569244. <https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1569244>
7. Sghaier S., Sailleau C., Marcacci M., Thabet S., Curini V., Ben Hassine T., et al. Epizootic haemorrhagic disease virus serotype 8 in Tunisia, 2021. *Viruses*. 2022; 15 (1):16. <https://doi.org/10.3390/v15010016>
8. Shirafuji H., Kato T., Yamakawa M., Tanaka T., Minemori Y., Yanase T. Characterization of genome segments 2, 3 and 6 of epizootic hemorrhagic disease virus strains isolated in Japan in 1985–2013: identification of their serotypes and geographical genetic types. *Infection, Genetics and Evolution*. 2017; 53: 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.05.010>
9. Yang H., Li Z., Wang J., Li Z., Yang Z., Liao D., et al. Novel serotype of epizootic hemorrhagic disease virus, China. *Emerging Infectious Diseases*. 2020; 26 (12): 3081–3083. <https://doi.org/10.3201/eid2612.191301>
10. Xin J., Dong J., Li J., Ye L., Zhang C., Nie F., et al. Current knowledge on epizootic haemorrhagic disease in China. *Vaccines*. 2023; 11 (6): 1123. <https://doi.org/10.3390/vaccines11061123>
11. He Y., Meng J., Li N., Li Z., Wang D., Kou M., et al. Isolation of epizootic hemorrhagic disease virus serotype 10 from *Culicoides tainanus* and associated infections in livestock in Yunnan, China. *Viruses*. 2024; 16 (2):175. <https://doi.org/10.3390/v16020175>

12. Ruder M. G., Howerth E. W. Recognition of field signs, necropsy procedures, and evaluation of macroscopic lesions of cervids infected with epizootic hemorrhagic disease virus. In: *Epizootic Hemorrhagic Disease Virus. Methods in Molecular Biology*. Ed. C. Batten. New York: Humana; 2024; 2838: 17–64. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-4035-7_2
13. Golender N., Hoffmann B. The molecular epidemiology of epizootic hemorrhagic disease viruses identified in Israel between 2015 and 2023. *Epidemiologia*. 2024; 5 (1): 90–105. <https://doi.org/10.3390/epidemiologia5010006>
14. Ruder M. G., Johnson D., Ostlund E., Allison A. B., Kienzie C., Phillips J. E., et al. The first 10 years (2006–15) of epizootic hemorrhagic disease virus serotype 6 in the USA. *Journal of Wildlife Diseases*. 2017; 53 (4): 901–905. <https://doi.org/10.7589/2016-12-284>
15. Ishaq M., Jamal S. M., Teodori L., Leone A., Bonfini B., Spedicato M., Savini G. Serological evidence of epizootic hemorrhagic disease and serotypes of epizootic hemorrhagic disease virus in Pakistan. *Acta Tropica*. 2025; 267:107675. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2025.107675>
16. Yang Z., He Y., Meng J., Li S., Li N., Wang J., Song J. Isolation of four serotypes of epizootic hemorrhagic disease virus from *Culicoides* spp. and their associated infections in cattle in Yunnan, China. *mSphere*. 2025; 10 (8):e00274–25. <https://doi.org/10.1128/msphere.00274-25>
17. Rivera N. A., Varga C., Ruder M. G., Dorak S. J., Roca A. L., Novakofski J. E., Mateus-Pinilla N. E. Bluetongue and epizootic hemorrhagic disease in the United States of America at the wildlife-livestock interface. *Pathogens*. 2021; 10 (8):915. <https://doi.org/10.3390/pathogens10080915>
18. Allen S. E., Jardine C. M., Hooper-McGrevy K., Ambagala A., Bosco-Lauth A. M., Kunkel M. R., et al. Serologic evidence of arthropod-borne virus infections in wild and captive ruminants in Ontario, Canada. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2020; 103 (5): 2100–2107. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-0539>
19. Kato T., Shirafuji H., Tanaka S., Sato M., Yamakawa M., Tsuda T., Yanase T. Bovine arboviruses in *Culicoides* biting midges and sentinel cattle in southern Japan from 2003 to 2013. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2016; 63 (6): e160–e172. <https://doi.org/10.1111/tbed.12324>
20. Qi Y., Wang F., Chang J., Zhang Y., Zhu J., Li H., Yu L. Identification and complete-genome phylogenetic analysis of an epizootic hemorrhagic disease virus serotype 7 strain isolated in China. *Archives of Virology*. 2019; 164 (12): 3121–3126. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04412-9>
21. Verdezoto J., Breard E., Viarouge C., Quenault H., Lucas P., Sailleau C., et al. Novel serotype of bluetongue virus in South America and first report of epizootic haemorrhagic disease virus in Ecuador. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2018; 65 (1): 244–247. <https://doi.org/10.1111/tbed.12625>
22. Mejri S., Dhaou S. B., Jemli M., Bréard E., Sailleau C., Sghaier S., et al. Epizootic haemorrhagic disease virus circulation in Tunisia. *Veterinaria Italiana*. 2018; 54 (1): 87–90. <https://doi.org/10.12834/VetIt.973.5129.2>
23. Ben Hassine T., García-Carrasco J.-M., Sghaier S., Thabet S., Lorusso A., Savini G., Hammami S. Epidemiological analyses of the first incursion of the epizootic hemorrhagic disease virus serotype 8 in Tunisia, 2021–2022. *Viruses*. 2024; 16 (3):362. <https://doi.org/10.3390/v16030362>
24. Anthionioz C., Abadie Y., Reversat E., Lafargue A., Delalande M., Renaudineau T., et al. Heterogeneous within-herd seroprevalence against epizootic hemorrhagic disease virus type 8 (EHDV-8) after massive virus circulation in cattle in France, 2023. *Frontiers in Veterinary Science*. 2025; 12:1562883. <https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1562883>
25. Lorusso A., Cappai S., Loi F., Pinna L., Ruiu A., Puggioni G., et al. Epizootic hemorrhagic disease virus serotype 8, Italy, 2022. *Emerging Infectious Diseases*. 2023; 29 (5): 1063–1065. <https://doi.org/10.3201/eid2905.221773>
26. Zientara S., Bréard E., Vitour D., Sailleau C. Emergence of epizootic hemorrhagic disease in Europe. *Virologie*. 2023; 27 (1): 16–17. <https://doi.org/10.1684/vir.2023.987>
27. González-Recio O., Fernández A., Jiménez Montero J. A. Epidemiological and genetic factors affecting severe epizootic hemorrhagic disease in Spanish Holstein cattle during the Southern Europe outbreak of 2023. *Journal of Dairy Science*. 2025; 108 (4): 3850–3857. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25520>
28. Martínez R., De Los Angeles Rialde M., Cano-Terriza D., Lorusso A., Spedicato M. From Africa to Europe: the rise of epizootic haemorrhagic disease virus serotype 8. *Veterinaria Italiana*. 2025; 61 (4). <https://doi.org/10.12834/VetIt.3793.35560.1>
29. Hochstrasser A. L., Veronesi E., Verhulst N. O. *Culicoides obsoletus* (biting midge). *Trends in Parasitology*. 2025; 41 (8): 701–702. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2025.06.006>
30. McGregor B. L., Sloyer K. E., Sayler K. A., Goodfriend O., Krauer J. M. C., Acevedo C., et al. Field data implicating *Culicoides stellifer* and *Culicoides venustus* (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of epizootic hemorrhagic disease virus. *Parasites & Vectors*. 2019; 12:258. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3514-8>
31. Becker M., Gentry G., Husseneder C., Foil L. Seven-year prospective study on yearly incidence of *Orbivirus* infection of captive white-tailed deer and potential *Culicoides* vectors. *Journal of Medical Entomology*. 2024; 61 (2): 465–472. <https://doi.org/10.1093/jme/tjae006>
32. Dorak S. J., Varga C., Ruder M. G., Gronemeyer P., Rivera N. A., Dufford D. R., et al. Spatial epidemiology of hemorrhagic disease in Illinois wild white-tailed deer. *Scientific Reports*. 2022; 12 (1):6888. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10694-y>
33. Hudson A. R., McGregor B. L., Shults P., England M., Silbernagel C., Mayo C., et al. *Culicoides*-borne *Orbivirus* epidemiology in a changing climate. *Journal of Medical Entomology*. 2023; 60 (6): 1221–1229. <https://doi.org/10.1093/jme/tjad098>
34. Rocklöv J., Dubrow R. Climate change: an enduring challenge for vector-borne disease prevention and control. *Nature Immunology*. 2020; 21 (5): 479–483. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0648-y>
35. Trebski A., Gourlay L., Gibb R., Imrizian N., Redding D. W. Climate sensitivity is widely but unevenly spread across zoonotic diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2025; 122 (50):e2422851122. <https://doi.org/10.1073/pnas.2422851122>
36. Bibard A., Martinetti D., Giraud A., Picado A., Chalvet-Monfray K., Porphyre T. Quantitative risk assessment for the introduction of bluetongue virus into mainland Europe by long-distance wind dispersal of *Culicoides* spp.: a case study from Sardinia. *Risk Analysis*. 2025; 45 (1): 108–127. <https://doi.org/10.1111/risa.14345>
37. Bibard A., Martinetti D., Picado A., Chalvet-Monfray K., Porphyre T. Spatial and temporal risk assessment of epizootic hemorrhagic disease virus introduction in Europe: a comparative analysis of trade and wind dispersal pathways. *Preventive Veterinary Medicine*. 2025; 245:106656. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2025.106656>
38. Gubbins S. Using the basic reproduction ratio to quantify transmission and identify data gaps for epizootic haemorrhagic disease virus. *Royal Society Open Science*. 2024; 11 (10):241217. <https://doi.org/10.1098/rsos.241217>
39. Петров Т. А., Дарман Ю. А., Сторожук В. Б., Титов А. С. Численность диких копытных животных на территории Уссурийского заповедника и сопредельных охотничьих хозяйств по результатам авиачуча (2023 г.). *Амурский зоологический журнал*. 2024; 16 (3): 731–746. <https://doi.org/10.33910/2686-9519-2024-16-3-731-746>
40. Петров Т. А., Дарман Ю. А., Титов А. С., Сторожук В. Б., Сонин П. Л., Марченкова Т. В. Изменения численности диких копытных на юго-западе Приморского края. *Russian Journal of Ecosystem Ecology*. 2025; 10 (1). <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2025-1-2>
41. Петров Т. А., Дарман Ю. А., Титов А. С., Сторожук В. Б., Сонин П. Л., Марченкова Т. В. Changes in the number of wild ungulates in the southwest Primorsky province, Russia. *Russian Journal of Ecosystem Ecology*. 2025; 10 (1). <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2025-1-2> (in Russ.)
42. Харзинова В. Р., Кошкина О. А. Оценка генетического разнообразия и генетической структуры популяций энвенкийской породы северного оленя: анализ микросателлитов. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2025; (3). <https://doi.org/10.60797/IJR.2025.153.100>
43. Khazinova V. R., Koshkina O. A. Evaluation of genetic diversity and genetic structure of Evenk reindeer populations: microsatellite analysis. *International Research Journal*. 2025; (3). <https://doi.org/10.60797/IJR.2025.153.100> (in Russ.)
44. Спрыгин А. В., Федорова О. А., Бабин Ю. Ю., Кононов А. В., Караулов А. К. Мокрецы рода *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) и их роль в распространении блютанга и болезни Шмалленберга в России (обзор). *Сельскохозяйственная биология*. 2015; 50 (2): 183–197. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.2.183rus>
45. Sprygin A. V., Fedorova O. A., Babin Yu. Yu., Kononov A. V., Karaulov A. K. Blood-sucking midges from the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) act as filed vectors of human and animal diseases (review). *Agricultural Biology*. 2015; 50 (2): 183–197. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.2.183eng>
46. De Leeuw I., Villalba R., Agüero M., Mostin L., De Regge N. Influence of inoculation dose and route on EHDV-8 distribution and the induced immune response in experimentally infected cattle. *Veterinary Research*. 2025; 56 (1):222. <https://doi.org/10.1186/s13567-025-01652-3>
47. Lv M.-N., Zhu J.-B., Liao S.-Q., Yang Z.-X., Lin X.-H., Qi N.-S., et al. Seroprevalence of epizootic hemorrhagic disease virus in Guangdong cattle farms during 2013–2017, China. *Viruses*. 2023; 15 (6):1263. <https://doi.org/10.3390/v15061263>
48. Ponce K., Jurado J., Ramirez M., Vargas-Rocha L., Navarro-Mamani D. A. Seroprevalence and associated risk factors of epizootic hemorrhagic disease virus in cattle from the northern region of Peru: first serological report. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2025; 87 (10): 1180–1185. <https://doi.org/10.1292/jvms.25-0183>
49. Benn J. S., Orange J. P., Gomez J. P., Dinh E. T. N., McGregor B. L., Blosser E. M., et al. *Culicoides* midge abundance across years: modeling inter-annual variation for an avian feeder and a candidate vector of hemorrhagic diseases in farmed wildlife. *Viruses*. 2024; 16 (5):766. <https://doi.org/10.3390/v16050766>
50. Strasburg M., Christensen S. Evaluating the interaction of emerging diseases on white-tailed deer populations using an agent-based modeling approach. *Pathogens*. 2024; 13 (7):545. <https://doi.org/10.3390/pathogens13070545>
51. Díaz-Cao J. M., López-Lorenzo G., López-Novo C., Díaz P., Remesar S., López C., et al. Description of the clinical findings associated with the epizootic hemorrhagic disease in cattle from Northwestern Spain during the emergence. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2025; 2025:7808243. <https://doi.org/10.1155/tbed/7808243>

49. Garrett E. F., Po E., Bichi E. R., Hexum S. K., Melcher R., Hubner A. M. Clinical disease associated with epizootic hemorrhagic disease virus in cattle in Illinois. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2015; 247 (2): 190–195. <https://doi.org/10.2460/javma.247.2.190>
50. Şevik M. Assessment of role of epizootic hemorrhagic disease virus in abortion in cattle and small ruminants in Türkiye. *Research and Practice in Veterinary and Animal Science*. 2024; 1 (1): 19–26. <https://doi.org/10.69990/repvas.2024.1.1.3>
51. Spedicato M., Profeta F., Thabet S., Teodori L., Leone A., Portanti O., et al. Experimental infection of cattle, sheep, and goats with the newly emerged epizootic hemorrhagic disease virus serotype 8. *Veterinaria Italiana*. 2023; 59 (4). <https://doi.org/10.12834/VetIt.3433.23112.1>
52. Guan J., Qi Y., Huang Y., Shao R., Zhou D., Xi C., Yin X. Contrasting pathogenicity of an epizootic hemorrhagic disease virus serotype 7 isolate: high virulence in IFNAR^{-/-} mice versus a negligible role of sheep in EHDV-7 epidemiology. *Archives of Virology*. 2025; 170 (10):204. <https://doi.org/10.1007/s00705-025-06377-4>
53. Jiménez-Cabello L., Utrilla-Trigo S., Rodríguez-Sabando K., Carra-Valenzuela A., Illescas-Amo M., Calvo-Pinilla E., Ortego J. Vaccine candidates based on MVA viral vectors expressing VP2 or VP7 confer full protection against epizootic hemorrhagic disease virus in IFNAR^{-/-} mice. *Journal of Virology*. 2024; 98 (12):e0168724. <https://doi.org/10.1128/jvi.01687-24>
54. Sunwoo S. Y., Noronha L. E., Morozov I., Trujillo J. D., Kim I. J., Schirtzinger E. E., et al. Evaluation of a baculovirus-expressed VP2 subunit vaccine for the protection of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from epizootic hemorrhagic disease. *Vaccines*. 2020; 8 (1):59. <https://doi.org/10.3390/vaccines8010059>
55. Jiménez-Cabello L., Utrilla-Trigo S., Barreiro-Piñero N., Pose-Boirazian T., Martínez-Costas J., Marín-López A., Ortego J. Nanoparticle- and microparticle-based vaccines against *Orbiviruses* of veterinary importance. *Vaccines*. 2022; 10 (7):1124. <https://doi.org/10.3390/vaccines10071124>
56. Spedicato M., Ronchi G. F., Profeta F., Traini S., Capista S., Leone A., et al. Efficacy of an inactivated EHDV-8 vaccine in preventing viraemia and clinical signs in experimentally infected cattle. *Virus Research*. 2024; 347:199416. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2024.199416>
57. Covey H., Hall R. H., Krafur A., Matthews M. L., Shults P. T., Brelsfoard C. L. Cryptic *Wolbachia* (*Rickettsiales: Rickettsiaceae*) detection and prevalence in *Culicoides* (*Diptera: Ceratopogonidae*) midge populations in the United States. *Journal of Medical Entomology*. 2020; 57 (4): 1262–1269. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa003>

Поступила в редакцию / Received 25.02.2026

Поступила после рецензирования / Revised 16.04.2026

Принята к публикации / Accepted 28.05.2026

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Беспалова Татьяна Юрьевна, начальник группы СамНИВИ – филиала ФГБНУ ФИЦВиМ, г. Самара, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-0264-0218>, 27bt@mail.ru

Tatiana Yu. Besspalova, Head of Group, Samara Research Veterinary Institute – Branch of Federal Research Center for Virology and Microbiology, Samara, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-0264-0218>, 27bt@mail.ru

Михалева Татьяна Владимировна, канд. вет. наук, ученый секретарь СамНИВИ – филиала ФГБНУ ФИЦВиМ, г. Самара, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-6411-6027>, tatyana_mihaleva@mail.ru

Tatyana V. Mikhaleva, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Academic Secretary, Samara Research Veterinary Institute – Branch of Federal Research Center for Virology and Microbiology, Samara, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-6411-6027>, tatyana_mihaleva@mail.ru

Вклад авторов: Авторы внесли равный вклад на всех этапах работы и написания статьи.

Contribution of the authors: All authors contributed equally to this work at all stages as well as to paper text writing.



<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-226-235>
УДК 619:618.19:616-002:636.2:612.124



Некоторые белки острой фазы при воспалительных процессах, в том числе в молочной железе коров (обзор)

М. Н. Исакова, Е. О. Кузнецова, Д. А. Оберюхтин

ФГБНУ «Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук» (ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН), ул. Белинского, 112а, г. Екатеринбург, 620142, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Врожденный иммунитет контролируется сложной сетью активирующих и регуляторных механизмов. Одним из важнейших факторов этой регуляции является реакция острой фазы в печени. В ответ на инфекцию или повреждение тканей в течение нескольких часов в печени резко меняется характер синтеза белка: повышается экспрессия так называемых положительных и отрицательных белков острой фазы. Наиболее широкое применение идентификация специфических белков получила в диагностике и оценке повреждений тканей организма человека, в том числе при воспалительных процессах, благодаря тому, что их концентрация быстро растет и значительно меняется при различных патологических процессах. Однако особенностью большинства белков острой фазы является неспецифичность по отношению к первопричине воспаления. Данный фактор обуславливает редкое использование в ветеринарии белков острой фазы в качестве основного диагностического теста для выявления конкретного заболевания.

Цель исследования. Обобщение данных по наиболее широко применяемым белкам острой фазы в клинической практике, а также изучение результатов имеющихся исследований в ветеринарии по исследованию белков острой фазы в диагностике воспалительных заболеваний, в том числе в молочной железе коров.

Материалы и методы. Систематизацию и обобщение в литературный обзор проводили с использованием элементов заявления PRISMA. В качестве инструмента для оценки методологического качества систематических обзоров и метаанализов использовали методику AMSTAR. Поиск и отбор оригинальных публикаций проводили на электронных ресурсах Scopus, Web of Science, PubMed, MedLine, ScienceDirect, eLibrary.

Результаты. В статье рассмотрены наиболее изученные белки острой фазы воспаления, описаны их основные эффекты. Установлено, что на данный момент изучено около 40 различных белков плазмы, которые относятся к белкам острой фазы. В ветеринарии при диагностике различных заболеваний, сопровождающихся воспалительным процессом, наиболее важными белками острой фазы являются С-реактивный белок, сывороточный амилоид А, гаптоглобин, альфа-1-кислый гликопротеин и липополисахарид-связывающий белок. Приведены данные по исследованию белков острой фазы у коров при воспалении в молочной железе.

Заключение. С помощью проведенного метаанализа выявлены наиболее значимые белки острой фазы, которые могут служить диагностическими маркерами мастита у коров, к ним относятся: сывороточный амилоид А, гаптоглобин, альфа-1-кислый гликопротеин и липополисахарид-связывающий белок.

Ключевые слова: обзор, белки острой фазы, воспаление, цитокины, основные эффекты, диагностические маркеры

Благодарности: Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России по теме № 0532-2026-0009 «Система метаболической коррекции, направленной на нормализацию ключевых звеньев обмена веществ, с целью прижизненного формирования продуктивности и получения качественной продукции от сельскохозяйственных животных и птиц».

Для цитирования: Исакова М. Н., Кузнецова Е. О., Оберюхтин Д. А. Некоторые белки острой фазы при воспалительных процессах, в том числе в молочной железе коров (обзор). *Ветеринария сегодня*. 2026; 15 (3): 226–235. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-226-235>

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Исакова Мария Николаевна, канд. вет. наук, старший научный сотрудник отдела репродуктивной биологии и неонатологии ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, ул. Белинского, 112а, г. Екатеринбург, 620142, Россия, tmarya105@yandex.ru

Some acute phase proteins in inflammatory processes, including those in mammary gland of cows (review)

Maria N. Isakova, Evgeniya O. Kuznetsova, Denis A. Oberyukhtin

Ural Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Belinskogo, 112a, Ekaterinburg 620142, Russia

ABSTRACT

Introduction. Innate immunity is controlled by a complex network of activating and regulatory mechanisms. One of the most important factors in this regulation is the acute phase response in the liver. Following infection or tissue damage, protein synthesis patterns in the liver change dramatically within a few hours: expression of the so-called positive and negative acute phase proteins (APPs) increases. The most common application of acute phase proteins is diagnostics and assessment of tissue damage in humans, *inter alia* in inflammatory processes. APPs are important for diagnosing inflammation because their concentrations rapidly increase and fluctuate significantly during various pathological processes. However, most APPs lack specificity with respect to the primary cause of inflammation. In veterinary medicine, this factor accounts for their rare use as a primary diagnostic test for a specific disease.

Objective. The aim of this review was to summarize data on the APPs most widely used in clinical practice and to examine the results of existing veterinary studies investigating APPs in the diagnosis of inflammatory diseases in the mammary gland of cows.

Materials and methods. The data were summarized for this literature review using the elements of the PRISMA statement. The AMSTAR method was used to assess the methodological quality of systematic reviews and meta-analyses. The search and selection of original publications was conducted using Scopus, Web of Science, PubMed, MedLine, ScienceDirect, and eLibrary databases.

Results. This article examines the most studied inflammatory APPs and describes their main effects. It has been established that approximately 40 different plasma proteins classified as APPs have been studied to date. In veterinary medicine, the most important APPs used to diagnose various diseases associated with inflammation include C-reactive protein, serum amyloid A, haptoglobin, alpha-1-acid glycoprotein, and lipopolysaccharide-binding protein. Data on APP studies in cows with mammary gland inflammation are presented.

Conclusion. The meta-analysis identified the most significant APPs that can serve as diagnostic markers for mastitis in cows. These include serum amyloid A, haptoglobin, alpha-1-acid glycoprotein, and lipopolysaccharide-binding protein.

Keywords: review, acute phase proteins, inflammation, cytokines, main effects, diagnostic markers

Acknowledgments: The study was funded from the budget as part of the fulfillment of state task of the Ministry of Education and Science of Russia No. 0532-2026-0009 "A system of metabolic correction aimed at normalizing key metabolic components for the purpose of intravital formation of productivity and obtaining high-quality products from farm animals and poultry".

For citation: Isakova M. N., Kuznetsova E. O., Oberyukhtin D. A. Some acute phase proteins in inflammatory processes, including those in mammary gland of cows (review). *Veterinary Science Today*. 2026; 15 (3): 226–235. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-226-235>

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

For correspondence: Maria N. Isakova, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Department of Reproductive Biology and Neonatology, Ural Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Belinskogo, 112a, Ekaterinburg 620142, Russia, tmarya105@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ

Врожденный иммунитет – это первая линия защиты от микробных патогенов, которая участвует в активации адаптивных иммунных реакций, а также в восстановлении тканей. Состоит из клеточного и гуморального звеньев. При этом клеточное звено использует молекулярные стратегии для распознавания микробных фрагментов и повреждения тканей, а гуморальное включает растворимые факторы. К клеткам, участвующим в клеточном звене врожденного иммунитета, относятся: фагоциты, которые могут поглощать и разрушать патогены, а также представлять их антигены Т- и В-клеткам, инициируя адаптивный иммунный ответ; дендритные клетки, которые распознают патогены с помощью паттерн-распознающих рецепторов, поглощают и уничтожают их, а также могут презентовать антигены; тучные клетки, эозинофилы, базофилы; врожденные лимфоидные клетки, например натуральные клетки-киллеры, которые уничтожают зараженные патогеном клетки; некоторые опухолевые клетки [1].

Молекулярные стратегии распознавания основаны на взаимодействии паттерн-распознающих рецепторов с патоген-ассоциированными молекулярными паттернами и молекулярными паттернами, связанными с повреждением тканей.

Гуморальная иммунная система состоит из различных классов молекул, таких как пентраксины, коллектин и фиколины, которые функционально являются предшественниками антител. Они инициируют активацию комплемента, опсонизируют микробы и поврежденные клетки, агглютинируют или нейтрализуют микробы и регулируют воспалительные процессы. Некоторые из этих молекул являются ключевыми компонентами острой фазы воспаления, которые

быстро вырабатываются в клетках печени и других тканях под воздействием первичных воспалительных цитокинов или микробных компонентов [2, 3, 4].

Клеточные сенсоры, реагирующие на повреждение тканей, инфекцию и нарушение обмена веществ, стратегически расположены на поверхности клеток, в эндосомальном компартменте и цитоплазме как профессиональных, так и непрофессиональных клеток врожденного иммунитета. К последним относятся гепатоциты – основной источник белков острой фазы (БОФ). В условиях гомеостаза и в ответ на воспаление вырабатываются компоненты гуморального звена врожденного иммунитета. Эти молекулы выполняют сложные функции, в том числе обеспечивают иммунную защиту, активируя комплемент и обладая опсонической активностью (анти-антитела) [5].

Термин «воспаление» включает в себя типовые формы реакций организма на действие различных повреждающих (флогогенных) факторов [4]. Врожденный ответ организма при воспалении начинается с неспецифической реакции, за которой следуют специфические. Гомеостаз организма нарушается и восстанавливается с помощью выраженного системного отклика, известного как реакция острой фазы. Он включает в себя множество поведенческих, физиологических, биохимических и пищевых изменений, затрагивающих многие системы органов, расположенных вдали от очага воспаления. В местах повреждения тканей и проникновения патогенов запускается ряд структурных и функциональных изменений. Ключевыми этапами этого каскада являются активация микроциркуляторного русла, клеточной иммунной системы и соединительной ткани, а также высвобождение медиаторов воспаления. Затем эти реакции усиливаются за счет перепроизводства провоспалительных цитокинов, высвобождаемых в системный кровоток.

Системные проявления воспаления включают лихорадку, изменения в количестве лейкоцитов, сердечно-сосудистые и эндокринные процессы, переориентацию метаболизма в сочетании с повышенной выработкой разнообразного набора молекул, называемых белками острой фазы [6]. БОФ представляют собой большую группу белков плазмы, образование которых в большинстве случаев происходит в печени в ответ на воспаление. Но могут синтезироваться и в других тканях, например, сывороточный амилоид А, помимо печени, может продуцироваться в желудочно-кишечном тракте, молочных железах, почках и дыхательных путях [7]. У всех видов млекопитающих синтез БОФ в основном регулируется провоспалительными цитокинами, такими как интерлейкин-6 (ИЛ-6), интерлейкин-1 (ИЛ-1) и фактор некроза опухоли (ФНО- α). БОФ являются частью врожденного иммунного ответа, их биологическая функция связана с защитой от патологических повреждений и восстановлением гомеостаза. Однако конкретный белок может оказывать как провоспалительное, так и противовоспалительное действие. Считается, что БОФ играют важную роль в оптимизации и связывании микроорганизмов и их продуктов жизнедеятельности, в активации системы комплемента, связывании клеточного детрита, такого как ядерные фракции, в нейтрализации ферментов, поглощении свободного гемоглобина и радикалов, а также в модулировании иммунного ответа организма [8]. На экспрессию БОФ могут влиять и экзогенные глюкокортикоиды, опосредованно воздействующие на их синтез через регуляцию цитокинов. Было показано, что снижение синтеза альбумина во время воспалительной реакции является результатом воздействия продуктов, вырабатываемых моноцитами/макрофагами [9]. Концентрация специфических БОФ в плазме крови меняется во время воспалительных процессов и способна возрастать или снижаться как минимум на 25%. Так, например, уровень церулоплазмينا может увеличиться на 50%, а содержание С-реактивного белка (СРБ) и сывороточного амилоида А – в 1000 раз. Белки, концентрация которых в плазме увеличивается при воспалении, называются положительными (позитивными) БОФ, к ним относятся, например: СРБ, сывороточный амилоид А, лактоферрин. Белки, уровень которых снижается при воспалении, называются отрицательными (негативными) БОФ, среди них альбумин, трансферрин. Выделяют еще нейтральные белки (альфа-2-макроглобулин, гемопексин), концентрация которых при воспалении остается практически в пределах нормальных значений [10].

Повышение содержания БОФ в плазме способствует защите организма, облегчая распознавание вторгшихся микроорганизмов, мобилизацию лейкоцитов в кровотока и усиление притока крови к поврежденным или инфицированным участкам. Эти действия способствуют накоплению эффекторных молекул и лейкоцитов, они усиливают локальное воспаление и противомикробную защиту. В то же время БОФ ограничивают системное распространение воспаления в незатронутых тканях. Этот эффект реализуется путем нейтрализации провоспалительных молекул в кровотоке, снижая реакцию циркулирующих лейкоцитов и предотвращая активацию эндотелия [11].

До сих пор изучено около 40 различных белков плазмы, которые относятся к БОФ, применимых в качестве

биомаркеров для выявления различных заболеваний в медицине. В ветеринарной практике определение БОФ более широко используется для диагностики, прогноза и мониторинга лечения мелких домашних животных. У сельскохозяйственных животных исследование БОФ на сегодняшний день не нашло повсеместного применения в качестве диагностического критерия из-за недостаточной специфичности [12].

Одним из экономически значимых заболеваний молочного стада является мастит, который может развиваться на различных физиологических этапах жизненного цикла животного: во время лактации, в период запуска, сухостоя и сразу после отела [13, 14]. Мастит у коров – это воспалительная реакция молочной железы на проникновение патогенных микроорганизмов (стрептококков, стафилококков, кишечной палочки и др.) [15]. В процессе воспаления наблюдаются сосудистые изменения, нарушается проницаемость капиллярных мембран, в ткани воспалительного очага из кровеносных сосудов поступает экссудат с высоким содержанием белка. Это приводит к накоплению кислых продуктов обмена и распаду тканей, развивается отек. В начале острого воспаления расширяются лимфатические сосуды, но на следующих этапах вокруг зоны воспаления формируется барьер, который препятствует проникновению токсических продуктов и бактерий в лимфатические сосуды, что приводит к нарушению функции лимфатической системы. Также наблюдаются изменения в альвеолах и молочных протоках, выражающиеся в сдвиге pH в щелочную сторону, появлении сгустков и хлопьев казеина или крошек и пленок фибрина в секрете пораженной части вымени. Во время воспаления молочной железы в молоке выделяются многочисленные белки антибактериальной и иммунной защиты, включая БОФ, кателицидины, цитокины, хемокины и факторы роста, которые потенциально могут служить маркерами мастита. Это связано с тем, что при патологическом процессе в вымени у коров в острую фазу иммунного ответа в сыворотке крови изменяется активность медиаторов воспаления, что сопровождается изменениями концентрации БОФ. При мастите БОФ перемещаются из системного кровотока в молочную железу или же может происходить их синтез непосредственно в ее тканях [16].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на базе отдела репродуктивной биологии и неонатологии Уральского НИВИ – структурного подразделения ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН в рамках государственного задания Минобрнауки России по теме № 0532-2026-0009 «Система метаболической коррекции, направленной на нормализацию ключевых звеньев обмена веществ, с целью прижизненного формирования продуктивности и получения качественной продукции от сельскохозяйственных животных и птицы».

Поиск и подбор оригинальных публикаций проводили в январе – августе 2025 г. на электронных ресурсах Scopus, Web of Science, PubMed, MedLine, ScienceDirect, eLibrary. Параметрами для отбора литературы были выбраны следующие слова и словосочетания: «воспаление», «белки острой фазы», «медицина», «ветеринария», «С-реактивный белок», «лактоферрин», «ферритин», «альфа-1-кислый гликопротеин», «альфа-1-антитрипсин», «гаптоглобин»,

«альфа-1-антихимотрипсин», «сывороточный амилоид А», «гемопексин», «альфа-2-макроглобулин», «липополисахарид-связывающий белок», «мастит», «молочная железа», «коровы». В зарубежных базах данных были использованы такие поисковые запросы, как: “inflammation” [MeSH Terms] OR “inflammation” [All Fields] AND “acute phase proteins in inflammation” [MeSH Terms] OR “acute phase proteins in inflammation” [All Fields] AND “application of acute phase proteins in medicine” [MeSH Terms] AND “application of acute phase proteins in veterinary medicine” [MeSH Terms] AND “C-reactive protein in inflammation” [All Fields] AND “Lactoferrin in inflammation” [All Fields] AND “Ferritin in inflammation” [All Fields] AND “Alpha-1-acid glycoprotein in inflammation” [All Fields] AND “Alpha-1-antitrypsin” [All Fields] AND “Haptoglobin” [All Fields] AND “Alpha-1-antichymotrypsin” [All Fields] AND “Serum amyloid A” [All Fields] AND “Hemopexin” [All Fields] AND “Alpha-2-macroglobulin” [All Fields] AND “Lipopolysaccharide-binding protein” [All Fields] AND “acute phase proteins in cows with mastitis” [MeSH Terms] OR “acute phase proteins in cows with mastitis” [All Fields] AND “acute phase proteins in the mammary gland of cows” [MeSH Terms] OR “acute phase proteins in the mammary gland of cows” [All Fields].

Ретроспекция отобранных источников составила временной отрезок с 1991 по 2025 г., общий объем просмотренных ссылок – 285. Обобщение данных в литературный обзор проводили с использованием элементов заявления PRISMA [17].

Систематический обзор включал в себя следующие последовательные этапы:

1) поиск и отбор оригинальных публикаций об исследованиях механизма действия БОФ при воспалительных процессах в организме млекопитающих, в частности при мастите у коров;

2) оценка методологического качества отобранных исследований БОФ;

3) анализ доказательств эффективности использования БОФ в диагностике воспаления в молочной железе коров.

Использовались следующие критерии отбора публикаций:

- исследуемое вмешательство – БОФ при воспалительных процессах и в молочной железе коров;
- вмешательство сравнения – применение исследуемых БОФ в медицинской и ветеринарной практике для диагностики воспалительных процессов;
- исследуемая популяция – человек, продуктивные и непродуктивные животные.

В качестве инструмента для оценки методологического качества систематических обзоров и метаанализов использовали методику AMSTAR (A MeaSurement Tool to Assess Reviews), в основе которой лежат критерии руководства Кокрановского сотрудничества. Оценку методологического качества включенных исследований проводили для всех отобранных научных работ. Рассматривали следующие критерии экспериментальной и клинической эффективности применения БОФ в диагностике заболеваний, характеризующихся воспалением, в медицинской и ветеринарной области:

- определение наиболее широко применяемых БОФ в качестве специфического инструмента в диагностике воспалительных заболеваний;
- определение механизма действия изучаемых БОФ в ответ на воспаление.

Разногласия относительно включения публикации в систематический обзор разрешали с привлечением третьего и четвертого исследователя. Сомнения относительно включения публикации в систематический обзор разрешали путем ранжирования по таким параметрам, как ретроспекция, цитируемость, immediacy index, g-index, impact factor. Таким образом, для настоящего систематического обзора было отобрано 63 научные работы, опубликованные в период с 1999 по 2025 г., которые соответствовали нашим критериям отбора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Белки острой фазы считаются как медиаторами, так и ингибиторами воспаления, действующими в различных местах. Классические компоненты системы комплемента C3a и C5a являются БОФ и играют центральную провоспалительную роль в иммунитете [18]. Провоспалительные функции БОФ включают в себя активацию комплемента и опсонизацию, хемоаттрактантную активность, нейтрализацию инфекционных агентов и влияние на нейтрофилы. Так, некоторые БОФ (например, СРБ) активируют систему комплемента по классическому пути, что усиливает фагоцитоз и способствует элиминации опасных частиц. Другие БОФ привлекают клетки иммунной системы (моноциты, макрофаги) в очаг воспаления, выполняя роль хемоаттрактантов. Некоторые белки могут связывать компоненты микроорганизмов, токсинов или поврежденных тканей, препятствуя их распространению. Например, фибриноген может увеличивать интенсивность реакции респираторного взрыва нейтрофилов – процесса, при котором клетки продуцируют активные формы кислорода и галогены для уничтожения патогенов. В то же время церулоплазмин способен ингибировать эту реакцию. Таким образом, иммунологический компонент БОФ заключается в их роли во врожденном иммунном ответе организма на воспаление, повреждение тканей, инфекцию или другие патологические процессы, а также в восстановлении гомеостаза и защите организма [3].

Непосредственная врожденная защита организма от заболеваний, то есть реакция острой фазы, характеризуется как печеночным, так и внепеченочным усилением выработки и высвобождением в кровотоке различных БОФ, как правило, в течение 24–48 ч после первичного воздействия. Фагоциты при этом вызывают локальную провоспалительную реакцию и привлекают дополнительную помощь, выделяя цитокины, такие как ИЛ-6, ИЛ-1, ИЛ-8, ФНО- α и IFN- γ (интерферон-гамма). Эти ключевые медиаторы циркулируют в крови, вызывают нейроэндокринные и поведенческие изменения (лихорадку, гипонатриемию, анорексию, сонливость и вялость) и попадают в печень, где гепатоциты также могут действовать как иммунологические агенты и играть центральную роль в системном врожденном иммунном ответе за счет внутрисосудистой секреции антигенпрезентирующих клеток [3, 19].

Запуск системы комплемента приводит к хемотаксису, экссудации плазменных белков в очагах воспаления и опсонизации инфекционных агентов и поврежденных клеток. Система фибринолиза, включающая фибриноген, плазминоген, ингибитор активатора плазминогена, а также активаторы плазминогена, такие как тканевый активатор плазминогена и урокиназа, играет активную роль в восстановлении и ремоделировании тканей. Также белки плазмы крови обладают противовоспалительным

действием. Например, антиоксиданты гаптоглобин и гемопексин защищают от активных форм кислорода, альфа-1-антитрипсин и альфа-2-антитрипсин ингибируют протеолитические ферменты. Некоторые связывающие металлы белки, такие как церулоплазмин, связывающий медь, и гемопексин, связывающий гем, действуют более целенаправленно против патогенов. Другие белки напрямую участвуют во врожденном иммунитете против патогенов. Известно, что липополисахарид-связывающий белок взаимодействует с бактериальным липополисахаридом, перенося его на поверхности макрофагов и В-клеток. Некоторые БОФ могут защищать клетки от гибели в результате апоптоза. Например, было показано, что альфа-1-кислый гликопротеин и альфа-1-антитрипсин блокируют сигналы апоптоза [20]. Существует много заболеваний, при которых индукция специфических БОФ соответствует степени и развитию воспалительных процессов, следовательно, повышенный уровень БОФ может иметь диагностическую и прогностическую ценность. Исследование БОФ в качестве маркера воспаления эффективно для мониторинга течения заболеваний и контроля эффективности лечения. Концентрация этих белков в крови быстро изменяется при воспалительном процессе. Однако диагностическая значимость тестов на БОФ лимитируется их неспецифичностью. То есть изменения концентрации белков происходят при многих патологических процессах, например инфекционных поражениях, травмах, токсической или аутоиммунной реакции, злокачественных новообразованиях, и не являются специфичными для какого-то одного состояния [21]. При этом определение БОФ при воспалительных заболеваниях остается важно по таким причинам, как мониторинг течения болезни, контроль эффективности лечения, оценка тяжести патологического процесса, определение скрытого воспаления.

Многообразие БОФ связано с многокомпонентностью воспалительного ответа, поэтому в их число входят не только протеины, относящиеся к семейству пентраксинов (СРБ, сывороточный амилоидный Р-компонент), транспортные белки (преальбумин, церулоплазмин, трансферрин) и ингибиторы протеаз (альфа-1-антитрипсин, альфа-макроглобулин, альфа-2-макроглобулин), но и факторы коагуляции и фибринолиза (фибриноген, альфа-2-антиплазмин и др.). Разберем некоторые БОФ, которые часто применяют в диагностике.

С-реактивный белок (СРБ) – первый идентифицированный представитель группы БОФ. William S. Tillet and Thomas Francis открыли в 1930 г. вещество, находящееся в сыворотке крови в острой фазе инфекции и способное связываться с С-полисахаридами клеточной стенки пневмококка [22]. Основным местом синтеза сывороточного СРБ являются гепатоциты. Главная роль в образовании данного белка принадлежит ИЛ-1 и ИЛ-6. СРБ является уникальным маркером острого ответа. Он относится к самым чувствительным (увеличение в 20–100 раз, в отдельных случаях – в 1000 раз) и самым быстрым (в первые 6–8 ч) показателям повреждения. Кроме того, СРБ является компонентом неспецифического иммунного ответа, встречается на ранних стадиях воспаления после проникновения антигена в организм и действует как опсонин посредством стимуляции фагоцитоза нейтрофилов и макрофагов [23]. СРБ способен активировать комплемент по классическому пути комплексом «антиген –

антитело» с участием в связывании антигена одной молекулы IgM или двух молекул IgG, привлекая в очаг воспаления моноциты. Альтернативный путь может активироваться эндотоксином грамотрицательных бактерий, полисахаридами типа инулина и зимозана, иммунными комплексами, содержащими IgA, IgG, компонентами клеточных стенок грибов [24]. При этом СРБ осуществляет и другую важную задачу – способствует удалению эндогенных веществ, образующихся при деструкции клеток. Таким образом, СРБ у млекопитающих выполняет преимущественно иммунорегуляторную функцию: он регулирует иммунные и неспецифические реакции, координируя их совместную работу [25].

Сывороточный амилоид А – это консервативное семейство БОФ, которые в основном вырабатываются в печени, но также экспрессируются во внепеченочных тканях во время воспаления. Как ключевой компонент ответа острой фазы данный белок демонстрирует динамичную активацию, при этом его уровень повышается в 1000 раз во время воспаления, что подчеркивает его значение в модуляции иммунитета и патогенезе заболевания. Примечательно, что сывороточный амилоид А способствует развитию хронического воспаления, фиброза и резистентности к терапии, но в то же время играет защитную роль при инфекциях и восстановлении тканей [26].

Альфа-1-кислый гликопротеин, также известный как орозомикоид, относится к семейству белков липокалина. В основном он содержится в плазме, при этом главный его источник – печень, но он также вырабатывается в других органах, таких как мозг и жировая ткань [27]. Данный белок моделирует функциональную активность эндотелиоцитов, поддерживает их отрицательный заряд и регулирует проницаемость, способствует антигистаминному эффекту. Неспецифическая защитная функция альфа-1-кислого гликопротеина заключается в торможении генерации супероксидного анион-радикала (супероксид-радикала) и блокировании процессов запрограммированной клеточной гибели, вызванной действием ФНО-α. Также этот белок ингибирует миграцию нейтрофилов в окружающие ткани, регулирует пролиферацию лимфоцитов и блокирует активацию системы комплемента. Орозомикоид оказывает дозозависимый эффект на тромбоциты, эритроциты и плазминоген. Воспаление вызывает не только повышение концентрации альфа-1-кислого гликопротеина в сыворотке крови, но и качественные изменения в его углеводном компоненте, в результате чего образуется множество гликоформ, каждая из которых обладает различными, а иногда противоположными свойствами [28].

Липополисахарид-связывающий белок вырабатывается в основном в гепатоцитах, функционирует как секреторный БОФ и играет ключевую роль во врожденном иммунном ответе. Первоначально липополисахарид связывается с липополисахарид-связывающим белком, образуя комплекс, который в конечном итоге приводит к активации путей передачи сигнала и продукции цитокинов и других провоспалительных медиаторов (ИЛ-1 и ФНО-α). Липополисахарид-связывающий белок участвует в острой фазе иммунологического ответа на грамотрицательные бактерии, приводя к фагоцитозу и выведению из организма [29].

Гаптоглобин состоит из двух α - и двух β -цепей, соединенных дисульфидными мостиками. В кровотоке данный белок находится в полимеризованном состоянии или в комплексе с альбумином. Основная его функция заключается в связывании свободного гемоглобина, высвобождаемого из эритроцитов, и в подавлении таким образом его окислительного стресса [30]. Связывание гаптоглобина с гемоглобином также снижает доступность остатка гема для роста бактерий. Многочисленные исследования показали значимость этого белка как клинически полезного лабораторного показателя для измерения частоты и тяжести воспалительных реакций у крупного рогатого скота с различными заболеваниями [31]. В комплексе с гемоглобином гаптоглобин предотвращает токсическое действие свободного железа и обеспечивает его доставку в печень для дальнейшей переработки. Он также ингибирует синтез простагландинов и подавляет реакцию T-хелперов 2-го типа.

Лактоферрин является глобулярным гликопротеином, который участвует в связывании и транспорте ионов железа, а также в иммунных и воспалительных реакциях [32]. Он является основным компонентом специфических гранул нейтрофилов и секретируется при их активации. Лактоферрин участвует в механизме ингибирования перекисного окисления липидов, тем самым осуществляя защитную функцию клеток от окислительного повреждения [33]. Этот белок обладает способностью подавлять активацию системы комплемента, выработку интерлейкинов (в первую очередь ИЛ-6, ИЛ-1 и ФНО- α) и цитокинов, стимулирует фагоцитарную активность нейтрофилов и фагоцитов и обладает бактериостатической активностью, которая связана с лишением микробной клетки доступного железа, необходимого для ее жизнедеятельности [34, 35].

Ферритин является сложным белковым комплексом, состоящим из белковой оболочки (апоферритина) и ядра, включающего до 4000–4500 атомов трехвалентного железа. При наличии в организме воспалительного процесса в печени возникает усиленный синтез ферритина, который затем выделяется в системный кровоток и ведет себя как БОФ; апоферритин часто рассматривается как биомаркер острофазовой реакции воспаления. Его повышенный уровень в сыворотке крови связан с усиленной продукцией провоспалительных цитокинов. Одним из источников высокого уровня сывороточного ферритина при воспалительном процессе является его секреция макрофагами или высвобождение из клеток вследствие повреждения тканей. Концентрация ферритина в крови напрямую зависит от степени инфекционного процесса и уровня запасов железа в организме [36].

Альфа-1-антитрипсин – это БОФ из семейства ингибиторов сериновых протеаз. Он является многофункциональным белком и выполняет несколько задач, в том числе противовоспалительную, антибактериальную, антиапоптотическую и иммунорегуляторную функции. Основная его роль заключается в защите тканей и органов от повреждений, вызванных деградацией (протеолизом) белков на составляющие их молекулы посредством сериновых протеаз. Альфа-1-антитрипсин связан с развитием воспаления в легких и печени; немаловажная его роль в развитии иммуноопосредованных воспалительных заболеваний, на которые влияют факторы окружающей

среды и генетическая предрасположенность. Данный белок подавляет синтез и высвобождение медиаторов воспаления. Его противовоспалительная активность включает NF- κ B-зависимые механизмы, такие как индукция антагониста рецептора ИЛ-1. К основным эффектам альфа-1-антитрипсина при воспалении относят подавление функции эластазы, иммуномодулирующую активность, а также антиоксидантное и антимикробное действие [37].

Альфа-1-антихимотрипсин, ингибитор сериновых протеаз, в основном синтезируется в печени. Согласно некоторым исследованиям, этот белок также экспрессируется в мозге и аорте [38]. Являясь ингибитором сериновых протеаз, он может подавлять активность нейтрофильного катепсина и химазы тучных клеток, а также защищать клетки и ткани от повреждений, вызванных протеолизом после воспаления, что необходимо для поддержания тканевого гомеостаза и восстановления внеклеточного матрикса. Альфа-1-антитрипсин влияет на цитокиновый профиль, миграцию лейкоцитов, активацию и пролиферацию T-лимфоцитов.

Гемопексин – это белок плазмы крови, обладающий наибольшей способностью связывать гем и широко участвующий в модуляции различных физиологических и патологических процессов. Основная его физиологическая функция заключается в связывании и транспортировке свободного токсичного гема. Недавние исследования показали, что гемопексин выполняет функции антиоксиданта, антиапоптотического агента и модулятора иммунитета, а также регулирует механизмы органической защиты, направленные на уничтожение повреждающего фактора и восстановление поврежденной ткани [39]. Кроме того, данный белок участвует в регуляции дифференцировки клеток и восстановлении внеклеточного матрикса. В последние годы был достигнут значительный прогресс в понимании защитных механизмов гемопексина. Установлено, что этот белок может служить позитивным молекулярным биомаркером при воспалительных и онкологических заболеваниях.

Альфа-2-макроглобулин – это внеклеточная макромолекула, известная прежде всего как ингибитор протеаз широкого спектра действия. Представляя собой оптимальный субстрат для эндопептидаз всех каталитических типов, альфа-2-макроглобулин заманивает активные протеазы в свою молекулярную ловушку и впоследствии «помечает» их комплекс для выведения. Помимо роли регулятора внеклеточного протеолиза, он выполняет и другие функции, такие как переключение протеолиза на мелкие субстраты, содействие миграции клеток и связывание цитокинов, факторов роста и поврежденных внеклеточных белков. Эти функции особенно важны в контексте функционирования иммунных клеток. К основным эффектам альфа-2-макроглобулина относится связывание и участие в обезвреживании медиаторов воспаления (интерлейкинов, простагландинов, лизосомальных ферментов и др.). Альфа-2-макроглобулин участвует в захвате и обезвреживании патологических иммунных комплексов и соединений, находящихся в крови, а также в модуляции иммунных и воспалительных реакций. Альфа-2-макроглобулин проявляет иммуносупрессивные свойства, а также защищает от действия внешних токсинов и патогенов [40].

В ветеринарной медицине имеются различные результаты исследований БОФ. Так, существуют данные, что уровень сывороточного амилоида А в синовиальной жидкости повышается у лошадей с септическим артритом [41]. Например, измерение концентрации СРБ помогает оценить эффективность подобранной антибиотикотерапии при бактериальной пневмонии у собак и может быть критерием для их отмены [42]. В одном из исследований установлено, что концентрация сывороточного амилоида А выше у кошек с подтвержденным диагнозом воспалительных заболеваний, таких как инфекции верхних дыхательных путей, пневмония, пиометра и инфекционный перитонит, чем у здоровых кошек. Также у кошек с гипертиреозом были повышены уровни других острофазовых показателей (СРБ, альфа-1-кислого гликопротеина и гаптоглобина), что подтверждает наличие системного воспаления [43]. У кошек с воспалительными заболеваниями кишечника и мелкоклеточной лимфомой желудочно-кишечного тракта концентрация гаптоглобина в сыворотке крови была выше, чем у здоровых кошек. У кошек с онкологическими заболеваниями уровень альфа-1-антитрипсина в сыворотке крови был значительно выше, чем у здоровых, но различий между типами опухолей (карцинома, саркома, круглоклеточные опухоли) обнаружено не было [44].

У коз с контагиозной плевропневмонией степень повышения уровня острофазовых белков, таких как СРБ, гаптоглобин и альфа-1-антитрипсин, была выше, что дает возможность использовать их в качестве диагностического маркера данного заболевания [45].

Основными БОФ, которые демонстрируют высокий ответ при большинстве изученных заболеваний и синдромов у свиней, являются СРБ, гаптоглобин, сывороточный амилоид А. Результаты одного из исследований показывают, что СРБ может быть кандидатом на роль индикатора для назначения антибиотиков свиноматкам и оценки эффективности лечения [46].

У крупного рогатого скота сывороточный амилоид А может быть надежным биомаркером для диагностики клинического эндометрита и метрита, используемым для контроля лечения и оценки репродуктивной функции [47]. Имеются результаты исследования БОФ при инфекциях мочевыводящих путей, травматическом ретикулоперитоните и вирусных заболеваниях коров. Установлено значительное увеличение сывороточного амилоида А и гаптоглобина при всех указанных заболеваниях, повышение фибриногена при травматическом ретикулоперитоните, увеличение альфа-1-кислого гликопротеина при инфекциях мочевыводящих путей. При хромоте, обусловленной язвами подошвы, выявлено повышение уровня сывороточного амилоида А при нормальной концентрации гаптоглобина. Кроме того, у коров с межпальцевым ламинитом и хромотой, вызванными *Fusobacterium necrophorum*, в сыворотке крови установлен количественно более высокий уровень гаптоглобина и сывороточного амилоида А по сравнению с животными, у которых хромота не была связана с поражением *F. necrophorum* [48].

Среди БОФ особое внимание при воспалении молочной железы у крупного рогатого скота следует обращать на СРБ, сывороточный амилоид А, гаптоглобин, альфа-1-кислый гликопротеин и липополисахарид-

связывающий белок, их концентрация будет увеличиваться с тяжестью течения инфекции, воспаления или травмы молочной железы. БОФ в первую очередь важны для диагностики скрытого мастита у животных, концентрация их будет выше в сыворотке крови в ответ на воздействие воспалительных цитокинов.

При субклиническом мастите наблюдается значительное повышение уровня сывороточного альбумина А, молочного альбумина А, гаптоглобина, фибриногена, а также снижение уровня альбумина по сравнению со здоровыми коровами [49, 50]. Кроме того, при поражении большего количества долей вымени установлен более высокий уровень молочного амилоида А и гаптоглобина. При клиническом мастите как в молоке, так и в сыворотке крови все исследованные БОФ были значительно выше нормы. Чувствительность метода диагностики мастита при использовании в качестве биомаркеров указанных БОФ составила от 79 до 93%, а специфичность – от 80 до 100%. При мастите острофазовый иммунный ответ зависит от этиологии, при этом грамотрицательные бактерии вызывают более выраженную реакцию, чем грамположительные [51].

Мастит, вызванный грамотрицательными бактериями, известен своими тяжелыми клиническими признаками и характеризуется повреждением тканей, что стимулирует активацию СРБ. В соответствии с проведенным F. C. Thomas et al. исследованием [52], повышение концентрации СРБ наблюдали в образцах молока от коров с маститом, обусловленным *Escherichia coli*. Инфекции молочной железы, вызванные микроорганизмами *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., приводили к умеренному повышению концентрации СРБ в молоке. Авторы также сообщали о высокой концентрации СРБ в образцах молока, инфицированных *Streptococcus uberis* или *Streptococcus dysgalactiae*. Уровень СРБ в молоке при мастите, ассоциированном с *Mycoplasma* spp., недостаточно описан в литературе. Данные, представленные учеными [51], показывают, что патогены демонстрируют умеренную способность стимулировать выработку СРБ, что может указывать на отсутствие тяжелой воспалительной реакции при мастите, вызванном *Mycoplasma* spp. При заражении молочной железы *Coagulase-Negative Staphylococci* или *Enterococcus* spp. концентрация СРБ была ниже, чем при инфицировании *Mycoplasma*.

Сывороточный амилоид А вырабатывается вне печени здоровыми эпителиальными клетками молочной железы и при ее воспалении. Данный БОФ является наиболее изученным белком в качестве биомаркера субклинического мастита при исследовании молока жвачных животных, особенно молочных коров. Преимущественно сывороточный амилоид А исследуется методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов. В долях вымени коров с клиническим маститом наблюдается повышенный уровень молочного амилоида А, при этом его уровень выше при тяжелой форме течения заболевания по сравнению с легкой [53]. Его содержание в сыворотке и молоке коров с субклиническим маститом было, соответственно, в 3 и 100 раз выше, чем у здоровых животных [54]. Также показано, что самая высокая концентрация амилоида А была в молоке коров с маститом, вызванным *S. agalactiae* и *S. uberis* (3882,50 и 2587,75 нг/мл соответственно), в то время как самый низкий уровень выявлен в молоке коров с маститом,

инфицированных *S. dysgalactiae* (812,00 нг/мл) [50]. Установлено, что средняя концентрация уровня амилоида А в молоке более чем в 10 раз выше при мастите, вызванном кишечной палочкой, чем при мастите, обусловленном другими патогенами [52]. Имеются публикации, которые демонстрируют, что у коров с маститом, вызванным *Streptococcus* spp., было самое высокое содержание сывороточного амилоида А в молоке [55]. Концентрация сывороточного амилоида А была ниже при инфицировании вымени *Klebsiella pneumoniae* и *Enterococcus* spp., чем при заражении *Streptococcus* spp., и выше, чем при инфицировании *Mycoplasma* spp. и *S. aureus* [56].

Гаптоглобин, обнаруживаемый в молоке, обычно секретируется проницаемыми клетками сосудов молочной железы. Доказано, что его концентрация в молоке увеличивается при воздействии эндотоксина при мастите. Имеются данные, что уровень гаптоглобина повышается в молоке через 3 ч, а в крови – через 9 ч после воспаления, что указывает на быструю и специфическую выработку этого биомаркера молочной железой. Между тем наблюдали значительные различия в средней концентрации гаптоглобина при клиническом и субклиническом мастите. Установлено, что у коров, инфицированных микроорганизмами, ассоциированными с окружающей средой (например, *E. coli*, *K. pneumoniae* или *Streptococcus* spp.), уровень гаптоглобина выше, чем у животных, инфицированных другими патогенами [57]. При воспалении вымени, вызванном *Mycoplasma* spp. или *S. aureus*, содержание гаптоглобина в молоке повышается умеренно. Примерно в трети исследуемых образцов уровень данного БОФ был ниже предела обнаружения, что потенциально снижает его ценность как биомаркера мастита [51]. Напротив, исследования, проведенные другими учеными, показывают, что профили гаптоглобина, сывороточного амилоида, альфа-1-кислого гликопротеина продемонстрировали значительную корреляцию, указывая на возможность использования данных БОФ в качестве диагностических маркеров мастита крупного рогатого скота [58].

В долях вымени коров с клиническим маститом наблюдали повышенный уровень сывороточного амилоида А и гаптоглобина по сравнению с долями вымени здоровых коров. Содержание молочного амилоида А было выше при тяжелом клиническом мастите по сравнению с легкой формой. В отличие от клинического мастита, на уровень кателицидина и гаптоглобина при субклиническом мастите существенно влияли виды выявленных микроорганизмов и степень бактериологической обсемененности. Измерение уровня кателицидина, сывороточного амилоида А и гаптоглобина в молоке является надежным методом выявления коров с субклиническим или клиническим маститом.

В одном из исследований концентрация гаптоглобина, фибриногена, амилоида А, церулоплазмينا, ФНО- α , ИЛ-1 и ИЛ-6 у коров с маститом была статистически выше и может использоваться в качестве раннего индикатора мастита [59].

Имеются данные, что диагностическая ценность сывороточного альфа-1-кислого гликопротеина в дифференциации здоровых коров от животных с маститом была обусловлена за счет 62%-й чувствительности и 91%-й специфичности [60]. В другом исследовании было доказано, что альфа-1-кислый гликопротеин вырабатывается аль-

веолярными клетками молочной железы, но основная его часть в молоке выделяется лейкоцитами. Те же авторы сообщили, что при инфекции молочной железы концентрация альфа-1-кислого гликопротеина резко возрастает. Уровень альфа-1-кислого гликопротеина в молоке коров с субклиническим маститом, вызванным кишечной палочкой, стрептококком или стафилококком, был выше, чем у животных без мастита, при этом значение БОФ не различалось в зависимости от возбудителя [61]. В другом исследовании были выявлены значительные различия в концентрации орозомикуида в молоке коров с маститом, вызванным разными патогенами. Было установлено, что реакция в вымени у коров, подвергшихся воздействию липополисахаридов при заражении микроорганизмами *E. coli* или *S. aureus*, приводит к повышению содержания альфа-1-кислого гликопротеина [62]. Данных о концентрации альфа-1-кислого гликопротеина при мастите, вызванном *Mycoplasma* spp., достаточно мало, но результаты показывают, что данный патоген способен вызывать умеренное повышение уровня альфа-1-кислого гликопротеина [63].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в обзоре данные показывают актуальность дальнейшего изучения БОФ в диагностике воспалительных заболеваний, в особенности у сельскохозяйственных животных. Полученный массив научных результатов позволит выявить БОФ, которые можно использовать в качестве диагностических маркеров при конкретных заболеваниях. Например, у лошадей с септическим артритом биомаркером является повышение уровня сывороточного амилоида А. Концентрация СРБ повышается у кошек и собак с пневмонией и воспалительными заболеваниями, связанными с инфекциями верхних дыхательных путей. Изменение концентрации гаптоглобина в сыворотке крови у кошек является маркером воспалительных заболеваний кишечника и мелкоклеточной лимфомы желудочно-кишечного тракта. В качестве диагностического маркера контагиозной плевропневмонии у коз оценивается уровень СРБ, гаптоглобина и альфа-1-антитрипсина. У свиней основными БОФ, которые демонстрируют высокий ответ при большинстве изученных бактериальных заболеваний, являются СРБ, гаптоглобин, сывороточный амилоид А. У коров при эндометрите и метрите могут повышаться такие БОФ, как альфа-1-антитрипсин, альфа-2-макроглобулин, сывороточный амилоид А. При инфекциях мочевыводящих путей значительное увеличение наблюдается в концентрации сывороточного амилоида А, гаптоглобина, альфа-1-кислого гликопротеина. При травматическом ретикулитоперитоните повышение регистрируется в концентрации сывороточного амилоида А, гаптоглобина и фибриногена. При мастите у коров диагностическим маркером могут выступать такие БОФ, как сывороточный амилоид А, гаптоглобин, альфа-1-кислый гликопротеин и липополисахарид-связывающий белок, концентрация которых будет увеличиваться.

Также возможность исследования БОФ может позволить сократить применение антибиотиков, поскольку идентификация острофазовых белков помогает отделить бактериальные причины заболевания от неинфекционных, спрогнозировать исход болезни и эффективность лечения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Mantovani A, Garlanda C. Humoral innate immunity and acute-phase proteins. *New England Journal of Medicine*. 2023; 388 (5): 439–452. <https://doi.org/10.1056/nejmra2206346>
- Holmskov U, Thiel S, Jensenius J. C. Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annual Review of Immunology*. 2003; 21: 547–578. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.140954>
- Serrano I, Luque A, Aran J. M. Exploring the immunomodulatory moonlighting activities of acute phase proteins for tolerogenic dendritic cell generation. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9:892. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00892>
- Nathan C. Nonresolving inflammation redux. *Immunity*. 2022; 55 (4): 592–605. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.03.016>
- Medzhitov R. The spectrum of inflammatory responses. *Science*. 2021; 374 (6571): 1070–1075. <https://doi.org/10.1126/science.abi5200>
- Gabay C., Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New England Journal of Medicine*. 1999; 340 (6): 448–454. <https://doi.org/10.1056/nejm199902113400607>
- Alves A. E., Dantas Mota F. C., Stedile Fujimoto T. A., Rocha Sousa W. M., Di Filippo P. A. Acute phase protein response and their clinical application in veterinary medicine. *Veterinária Notícias*. 2020; 26 (1): 82–111. <https://doi.org/10.14393/VTN-v26n1-2020-53216>
- Jain S., Gautam V., Naseem S. Acute-phase proteins: as diagnostic tool. *Journal of Pharmacy and Biomedical Sciences*. 2011; 3 (1): 118–127. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.76489>
- Ward E. S., Gelinas D., Dreesen E., Van Santbergen J., Andersen J. T., Silvestri N. J., et al. Clinical significance of serum albumin and implications of FcRn inhibitor treatment in IgG-mediated autoimmune disorders. *Frontiers in Immunology*. 2022; 13:892534. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.892534>
- Каргальцева Н. М., Кочеровец В. И., Миронов А. Ю., Борисова О. Ю., Бурбелло А. Т. Маркёры воспаления и инфекция кровотока (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64 (7): 435–442. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-435-442>
- Kargal'tseva N. M., Kotcherovets V. I., Mironov A. Yu., Borisova O. Yu., Burbello A. T. Inflammation markers and bloodstream infection (review of literature). *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2019; 64 (7): 435–442. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-435-442> (in Russ.)
- Janciauskiene S., Welte T., Mahadeva R. Acute Phase Proteins: Structure and Function Relationship. In: *Acute Phase Proteins – Regulation and Functions of Acute Phase Proteins*. Ed. by F. Veas. 2011; Chapter 2: 25–60. <https://doi.org/doi:10.5772/18121>
- Ali A. A., Darwish W. S. Acute phase proteins patterns as biomarkers in bacterial infection: recent insights. *Open Veterinary Journal*. 2024; 14 (10): 2539–2550. <https://doi.org/10.5455/ovj.2024.v14.i10.4>
- Сидорова К. А., Драгич О. А., Роткин А. Т. Терапевтические мероприятия при маститах коров. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. 2022; (3): 227–230. <https://elibrary.ru/ihxxhu>
- Sidorova C. A., Dragich O. A., Rotkin A. T. Therapeutic measures for mastitis in cows. *Izvestia Orenburg State Agrarian University*. 2022; (3): 227–230. <https://elibrary.ru/ihxxhu> (in Russ.)
- Войченко Л. Г., Сысоенко В. В., Кубрак Я. А., Гнидина Ю. С., Кустов В. В. Диагностика и распространение мастита у коров. *Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания*. 2025; (3): 160–164. <https://doi.org/10.24412/2311-6447-2025-3-160-164>
- Voitenko L. G., Sysoenko V. V., Kubrak Ya. A., Gnidina Yu. S., Kustov V. V. Diagnosis and spread of mastitis in cows. *Technologies for the Food and Processing Industry of AIC – Healthy Food*. 2025; (3): 160–164. <https://doi.org/10.24412/2311-6447-2025-3-160-164> (in Russ.)
- Соколова О. В., Зубарева В. Д., Безбородова Н. А., Бытов М. В., Шкуратова И. А. Гены антибиотикорезистентности, патогенности и вирулентности *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, выделенных из репродуктивного тракта и молочной железы коров (*Bos taurus*) при воспалении. *Сельскохозяйственная биология*. 2024; 59 (6): 1221–1236. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2024.6.1221rus>
- Sokolova O. V., Zubareva V. D., Bezborodova N. A., Bytov M. V., Shkuratova I. A. Antibiotic resistance, pathogenicity and virulence genes of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, isolated from the reproductive tract and mammary gland of cattle (*Bos taurus*) during inflammation. *Agricultural Biology*. 2024; 59 (6): 1221–1236. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2024.6.1221eng>
- Giagu A., Penati M., Traini S., Dore S., Addis M. F. Milk proteins as mastitis markers in dairy ruminants – a systematic review. *Veterinary Research Communications*. 2022; 46 (2): 329–351. <https://doi.org/10.1007/s11259-022-09901-y>
- Tricco A. C., Lillie E., Zarin W., O'Brien K. K., Colquhoun H., Levac D., et al. PRISMA extension for scoping reviews (PRISMA-ScR): checklist and explanation. *Annals of Internal Medicine*. 2018; 169 (7): 467–473. <https://doi.org/10.7326/M18-0850>
- Megha K. B., Joseph X., Akhil V., Mohanan P. V. Cascade of immune mechanism and consequences of inflammatory disorders. *Phytomedicine*. 2021; 91:153712. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153712>
- Crispe I. N. Hepatocytes as immunological agents. *The Journal of Immunology*. 2016; 196 (1): 17–21. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501668>
- Janciauskiene S., Wrenger S., Welte T. Immunoregulatory Properties of Acute Phase Proteins – Specific Focus on α 1-Antitrypsin. In: *Acute Phase Proteins*. Ed. by S. Janciauskiene. 2013; Chapter 1: 2–29. <https://doi.org/10.5772/56393>
- Knight M. I., Chambers P. J. Problems associated with determining protein concentration: a comparison of techniques for protein estimations. *Molecular Biotechnology*. 2003; 23 (1): 19–28. <https://doi.org/10.1385/mb:23:1:19>
- Kushner I. C-reactive protein – my perspective on its first half century, 1930–1982. *Frontiers in Immunology*. 2023; 14:1150103. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1150103>
- Filep J. G. Targeting conformational changes in C-reactive protein to inhibit pro-inflammatory actions. *EMBO Molecular Medicine*. 2023; 15 (1):e17003. <https://doi.org/10.15252/emmm.202217003>
- Rizo-Téllez S. A., Sekheri M., Filep J. G. C-reactive protein: a target for therapy to reduce inflammation. *Frontiers in Immunology*. 2023; 26:14:1237729. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1237729>
- Zhou H.-H., Tang Y.-L., Xu T.-H., Cheng B. C-reactive protein: structure, function, regulation, and role in clinical diseases. *Frontiers in Immunology*. 2024; 15:1425168. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1425168>
- Cheng S., Duan D., Cui H., Lian Y., Jiang F., Chen Q., et al. Serum amyloid A: multifaceted roles in inflammation and cellular interactions. *Immunologic Research*. 2025; 73 (1):148. <https://doi.org/10.1007/s12026-025-09704-8>
- Ruiz M. Into the labyrinth of the lipocalin α 1-acid glycoprotein. *Frontiers in Physiology*. 2021; 12:686251. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.686251>
- Cecilian F., Lecchi C. The immune functions of α 1 acid glycoprotein. *Current Protein & Peptide Science*. 2019; 20 (6): 505–524. <https://doi.org/10.2174/1389203720666190405101138>
- Meng L., Song Z., Liu A., Dahmen U., Yang X., Fang H. Effects of Lipopolysaccharide-Binding Protein (LBP) Single Nucleotide Polymorphism (SNP) in infections, inflammatory diseases, metabolic disorders and cancers. *Frontiers in Immunology*. 2021; 12:681810. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.681810>
- Нарыжный С. Н., Легина О. К. Гептоглобин как биомаркер. *Биомедицинская химия*. 2021; 67 (2): 105–118. <https://doi.org/10.18097/PBMC20216702105>
- Naryzhny S. N., Legina O. K. Haptoglobin as a biomarker. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2021; 15 (3): 184–198. <https://doi.org/10.1134/S1990750821030069>
- Nazifi S., Saeb M., Ghasemian O., Esmailnezhad Z. Evaluation of serum haptoglobin in clinically healthy Iranian camels (*Camelus dromedarius*). *Comparative Clinical Pathology*. 2006; 15 (3): 195–197. <https://doi.org/10.1007/s00580-006-0640-4>
- Ohradanova-Repic A., Praženicová R., Gebetsberger L., Moskalets T., Skrabana R., Cehlar O., et al. Time to kill and time to heal: the multifaceted role of Lactoferrin and Lactoferricin in host defense. *Pharmaceutics*. 2023; 15 (4):1056. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041056>
- Rascón-Cruz Q., Siqueiros-Cendón T. S., Sianez-Estrada L. I., Villaseñor-Rivera C. M., Ángel-Lerma L. E., Olivas-Espino J. A., et al. Antioxidant potential of lactoferrin and its protective effect on health: an overview. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 26 (1):125. <https://doi.org/10.3390/ijms26010125>
- Fijałkowski P., Pomastowski P., van Eldik R., Rafińska K. Multifunctional role of Lactoferrin in metal ion interactions and biomedical applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2025; 321 (4):146531. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.146531>
- Rosa L., Ianiro G., Cutone A. Special issue "New insights into Lactoferrin". *International Journal of Molecular Sciences*. 2025; 26 (20):9891. <https://doi.org/10.3390/ijms26209891>
- Ameen I. A., Hussein H. S., Hasan E. K. The clinical applications of ferritin. *World Journal of Biology Pharmacy and Health Sciences*. 2022; 12 (1): 137–147. <https://doi.org/10.30574/wjbpshs.2022.12.1.0143>
- Wang T., Shuai P., Wang Q., Guo C., Huang S., Li Y., et al. α -1 Antitrypsin is a potential target of inflammation and immunomodulation (review). *Molecular Medicine Reports*. 2025; 31 (4):107. <https://doi.org/10.3892/mmr.2025.13472>
- Jin Y., Wang W., Wang Q., Zhang Y., Zahid K. R., Raza U., Gong Y. Alpha-1-antichymotrypsin as a novel biomarker for diagnosis, prognosis, and therapy prediction in human diseases. *Cancer Cell International*. 2022; 22 (1):156. <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02572-4>
- Yin X., Li X., Chen N., Mu L., Wu H., Yang Y., et al. Hemopexin as an acute phase protein regulates the inflammatory response against bacterial infection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021; 187: 166–178. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.109>
- Vandooren J., Itoh Y. Alpha-2-macroglobulin in inflammation, immunity and infections. *Frontiers in Immunology*. 2021; 12:803244. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.803244>
- Koziry R. V., Katselis G. S., Yoshimura S., Simko E., Bracamonte J. L. Temporal kinetics of serum amyloid A (SAA) concentration and identification of SAA isoforms in blood and synovial fluid of horses with experimentally induced septic arthritis, non-septic synovitis, and systemic inflammation. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2025; 37 (1): 42–54. <https://doi.org/10.1177/10406387241299873>
- Vitonen S. J., Lappalainen A. K., Christensen M. B., Sankari S., Rajamäki M. M. The utility of acute-phase proteins in the assessment of treatment response in dogs with bacterial pneumonia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2017; 31 (1): 124–133. <https://doi.org/10.1111/jvim.14631>
- Rossi G. Acute phase proteins in cats: diagnostic and prognostic role, future directions, and analytical challenges. *Veterinary Clinical Pathology*. 2023; 52 (Suppl. 1): 37–49. <https://doi.org/10.1111/vcp.13238>
- Love E. K., Leibman N. F., Ringold R., Lamb K. Serum haptoglobin concentrations in feline inflammatory bowel disease and small-cell

- alimentary lymphoma: a potential biomarker for feline chronic enteropathies. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2021; 23 (10): 959–964. <https://doi.org/10.1177/1098612x21991448>
45. El-Deeb W., Fayed M., Elshahy I., Salem M., Alhaider A., Kandeel M. Investigation of acute-phase proteins and cytokines response in goats with contagious caprine pleuropneumonia with special reference to their diagnostic accuracy. *PeerJ*. 2020; 8:e10394. <https://doi.org/10.7717/peerj.10394>
46. Jakobsen N., Weber N. R., Larsen I., Pedersen K. S. Diagnostic utility of acute phase proteins and their ability to guide antibiotic usage in pigs, horses, and cattle: a mapping review. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2024; 66 (1):45. <https://doi.org/10.1186/s13028-024-00766-6>
47. Kaya S., Merhan O., Kacar C., Colak A., Bozukluhan K. Determination of ceruloplasmin, some other acute phase proteins, and biochemical parameters in cows with endometritis. *Veterinary World*. 2016; 9 (10): 1056–1062. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.1056-1062>
48. Pirkkalainen H., Talvio I., Kujala-Wirth M., Soveri T., Orro T. Acute phase response of sole ulcer, white line disease and digital dermatitis in dairy cows. *Veterinary and Animal Science*. 2022; 17:100253. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2022.100253>
49. Kumar P., Sheikh A. A., Parkunan T., Dar M. R., Priyadarshini L., Preedaa M. G., et al. Acute phase proteins: how they portray mastitis – a review. *Agricultural Reviews*. 2015; 36 (4): 327–332. <https://doi.org/10.18805/ag.v36i4.6692>
50. Hussein H. A., El-Razik K. A., Gomaa A. M., Elbayoumy M. K., Abdelrahman K. A., Hosein H. I. Milk amyloid A as a biomarker for diagnosis of subclinical mastitis in cattle. *Veterinary World*. 2018; 11 (1): 34–41. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.34-41>
51. Dalanezi F. M., Schmidt E. M. S., Joaquim S. F., Guimarães F. F., Guerra S. T., Lopes B. C., et al. Concentrations of acute-phase proteins in milk from cows with clinical mastitis caused by different pathogens. *Pathogens*. 2020; 9 (9):706. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090706>
52. Thomas F. C., Geraghty T., Simões P. B. A., Mshelbwala F. M., Haining H., Eckersall P. D. A pilot study of acute phase proteins as indicators of bovine mastitis caused by different pathogens. *Research in Veterinary Science*. 2018; 119: 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.06.015>
53. Wollowski L., Heuvelink L., Kossatz A., Addis M. F., Puggioni G. M. G., Meriaux L., Bertulat S. The value of the biomarkers cathelicidin, milk amyloid A, and haptoglobin to diagnose and classify clinical and subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*. 2021; 104 (2): 2106–2122. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18539>
54. Kovačević-Filipović M., Ilić V., Vujčić Z., Dojnov B., Stevanov-Pavlović M., Mijačević Z., Božić T. Serum amyloid A isoforms in serum and milk from cows with *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2012; 145 (1–2): 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.10.015>
55. Bochniarz M., Szczubiał M., Brodzki P., Krakowski L., Dąbrowski R. Serum amyloid A as a marker of cow's mastitis caused by *Streptococcus* sp. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2020; 72:101498. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101498>
56. Pyörälä S., Hovinen M., Simojoki H., Fitzpatrick J., Eckersall P. D., Orro T. Acute phase proteins in milk in naturally acquired bovine mastitis caused by different pathogens. *Veterinary Record*. 2011; 168 (20):535. <https://doi.org/10.1136/vr.d1120>
57. Sadat A., Farag A. M. M., Elhanafi D., Awad A., Elmahallawy E. K., Alsowayeh N., et al. Immunological and oxidative biomarkers in bovine serum from healthy, clinical, and sub-clinical mastitis caused by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* infection. *Animals*. 2023; 13 (5):892. <https://doi.org/10.3390/ani13050892>
58. Eckersall P. D., Young F. J., McComb C., Hogarth C. J., Safi S., Weber A., et al. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Veterinary Record*. 2001; 148 (2): 35–41. <https://doi.org/10.1136/vr.148.2.35>
59. Tóthová C., Nagy O., Kováč G. The Use of Acute Phase Proteins as Biomarkers of Diseases in Cattle and Swine. In: *Acute Phase Proteins*. Ed. by S. Janciauskiene. 2013; Chapter 5: 103–138. <https://doi.org/10.5772/55857>
60. Cecilian F., Pocacqua V., Lecchi C., Fortin R., Rebucci R., Avallone G., et al. Differential expression and secretion of α_2 -acid glycoprotein in bovine milk. *Journal of Dairy Research*. 2007; 74 (3): 374–380. <https://doi.org/10.1017/S0022029907002646>
61. Guha A., Guha R., Gera S. Comparison of α_1 -antitrypsin, α_1 -acid glycoprotein, fibrinogen and NOx as indicator of subclinical mastitis in riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2013; 26 (6): 788–794. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12261>
62. Jiang L., Sørensen P., Røntved C., Vels L., Ingvarsten K. L. Gene expression profiling of liver from dairy cows treated intra-mammary with lipopolysaccharide. *BMC Genomics*. 2008; 9:443. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-443>
63. Hisaeda K., Arima H., Sonobe T., Nasu M., Hagiwara K., Kirisawa R., et al. Changes in acute-phase proteins and cytokines in serum and milk whey from dairy cows with naturally occurring peracute mastitis caused by *Klebsiella pneumoniae* and the relationship to clinical outcome. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2011; 73 (11): 1399–1404. <https://doi.org/10.1292/jvms.10-0403>

Поступила в редакцию / Received 30.03.2026

Поступила после рецензирования / Revised 29.04.2026

Принята к публикации / Accepted 18.05.2026

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Исакова Мария Николаевна, канд. вет. наук, старший научный сотрудник отдела репродуктивной биологии и неонатологии ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-7130-5627>, tmarya105@yandex.ru

Maria N. Isakova, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Department of Reproductive Biology and Neonatology, Ural Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-7130-5627>, tmarya105@yandex.ru

Кузнецова Евгения Оганесовна, старший специалист отдела репродуктивной биологии и неонатологии, ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия; <https://orcid.org/0009-0005-6275-3379>, Kuzjene@gmail.com

Evgeniya O. Kuznetsova, Senior Specialist, Department of Reproductive Biology and Neonatology, Ural Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia; <https://orcid.org/0009-0005-6275-3379>, Kuzjene@gmail.com

Оберюхтин Денис Андреевич, младший научный сотрудник отдела репродуктивной биологии и неонатологии ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия; <https://orcid.org/0009-0006-1497-5740>, oberuhtindenis@gmail.com

Denis A. Oberyukhtin, Junior Researcher, Department of Reproductive Biology and Neonatology, Ural Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia; <https://orcid.org/0009-0006-1497-5740>, oberuhtindenis@gmail.com

Вклад авторов: Исакова М. Н. – концепция обзора, проведение поисково-аналитической работы, подготовка текста статьи; Кузнецова Е. О. – проведение поисково-аналитической работы, подготовка текста статьи, редактирование статьи; Оберюхтин Д. А. – проведение поисково-аналитической работы, подготовка текста статьи, редактирование статьи.

Contribution of the authors: Isakova M. N. – conceptualization of the review, literature search and analysis, manuscript preparation; Kuznetsova E. O. – literature search and analysis, manuscript preparation, paper editing; Oberyukhtin D. A. – literature search and analysis, manuscript preparation, paper editing.



<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-236-240>



An overview of clinical features of equine pythiosis (*Pythium insidiosum*)

Júlia A. Silva Pinheiro

Centro Universitário UNA, Campus Linha Verde, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

ABSTRACT

Pythiosis is a chronic granulomatous disease affecting various animal species, most commonly equines. It occurs in tropical, subtropical, or temperate climates and is associated with waterlogged areas, such as swamps and ponds. The causative microorganism parasitizes aquatic plants and produces motile zoospores capable of infecting hosts through cutaneous lesions. Pathogenesis is associated with a predominant Th2-type immune response, characterized by the production of interleukins such as IL-4, IL-5, and IL-13, as well as intense eosinophilia and granulomatous inflammation, which contributes to the agent's persistence in tissues. Clinically, the disease is characterized by the formation of eosinophilic granulomas containing “kunkers”, necrotic masses composed of hyphae, collagen, and inflammatory cells. Various therapeutic approaches have been employed, including the use of antifungals, surgery, and immunotherapy. Surgical removal combined with immunotherapy is considered the most effective strategy, although treatment poses challenges due to the agent's unique characteristics; unlike true fungi, its cell wall contains cellulose and β -glucans. This study aims to analyze the biological and infectious aspects of *Pythium insidiosum* and to characterize the immunopathogenesis of equine pythiosis, focusing on the interaction between the etiological agent and the host immune response.

Keywords: review, pythiosis, immunopathogenesis, immunotherapy, oomycete, parasite

Acknowledgements: To my family, Narcy Silva, Agnaldo Pinheiro, and Alexandre Pinheiro, for their constant support, encouragement, and understanding throughout my academic journey. To my dear Dudu and Pandora, who, even though they are no longer with us, were great sources of affection and inspiration, contributing in a special way to my choice and love for Veterinary Medicine. To the newest member of the family, Toddy, whose presence brings daily joy and reinforces, once again, the bond and passion for animals.

For citation: Silva Pinheiro J. A. An overview of clinical features of equine pythiosis (*Pythium insidiosum*). *Veterinary Science Today*. 2026; 15 (3): 236–240. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-236-240>

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

For correspondence: Júlia A. Silva Pinheiro, Undergraduate Student, Centro Universitário UNA, Campus Linha Verde, Faculty of Veterinary Medicine, Belo Horizonte, Brazil, juliapinheiro1306@gmail.com

УДК 619:616.98:636.1:615.37

Обзор клинических проявлений питиоза лошадей (*Pythium insidiosum*)

Júlia A. Silva Pinheiro

Centro Universitário UNA, Campus Linha Verde, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

РЕЗЮМЕ

Питиоз — это хроническое гранулематозное заболевание, поражающее различные виды животных, чаще всего лошадей. Распространено в тропическом, субтропическом и умеренном климате, тесно связано с влажной почвой и со стоячей водой — болотами и прудами. Возбудитель обитает на водных растениях, образуя подвижные зооспоры, которые проникают в организм хозяина через поврежденную кожу. В основе патогенеза лежит преимущественно Th2-тип иммунного ответа, для которого характерны продукция интерлейкинов IL-4, IL-5 и IL-13, а также выраженная эозинофилия и гранулематозное воспаление, способствующее длительной персистенции возбудителя в тканях хозяина. Клинически болезнь проявляется формированием эозинофильных гранул, содержащих некротические массы, состоящие из гиф, коллагена и воспалительных клеток. Для терапии применяются различные подходы, включающие использование противогрибковых препаратов, хирургическое вмешательство и иммунотерапию. Хирургическое иссечение в сочетании с иммунотерапией считается наиболее эффективной стратегией, однако лечение сопряжено с трудностями из-за уникальных характеристик возбудителя: в отличие от истинных грибов, его клеточная стенка содержит целлюлозу и β -глюканы. Целью данного исследования является анализ биологических и инфекционных аспектов *Pythium insidiosum*, а также характеристика иммунопатогенеза питиоза у лошадей с акцентом на взаимодействие между этиологическим агентом и иммунным ответом хозяина.

Ключевые слова: обзор, питиоз, иммунопатогенез, иммунотерапия, оомицеты, паразиты

Благодарности: Искренне благодарю свою семью — Narcy Silva, Agnaldo Pinheiro, and Alexandre Pinheiro — за их постоянную заботу, поддержку и понимание на всех этапах моего пути в науке. Отдельное место в моем сердце занимают Dudu и Pandora, и, хотя их уже нет рядом с нами, именно они стали для меня неиссякаемым источником тепла и вдохновения, именно они во многом повлияли на мой выбор профессии и воспитали во мне преданность ветеринарному делу. Особую благодарность адресую самому младшему члену нашей семьи — Toddy, чье присутствие наполняет каждый день жизни радостью и напоминает мне о той особой связи, которая соединяет человека и животных.

Для цитирования: Silva Pinheiro J. A. Обзор клинических проявлений питиоза лошадей (*Pythium insidiosum*). *Ветеринария сегодня*. 2026; 15 (3): 236–240. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-236-240> (на англ.)

Конфликт интересов: Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Júlia A. Silva Pinheiro, студент бакалавриата, Университетский центр UNA, кампус «Зеленая линия», факультет ветеринарной медицины, Белу-Оризонти, Бразилия, juliapinheiro1306@gmail.com

INTRODUCTION

Equine pythiosis is a granulomatous infectious disease caused by the oomycete *Pythium insidiosum*, widely distributed in tropical and subtropical regions, where environmental conditions such as high humidity and the presence of stagnant water favor the maintenance of the agent in the environment [1, 2].

The disease mainly affects horses and is considered highly relevant in veterinary medicine due to its high morbidity and the economic losses associated with equine breeding [3, 4]. According to a review of 967 documented cases of pythiosis in humans and animals, horses are the most frequently affected animal species. In addition, approximately 75.2% of non-immunized equine cases required surgical intervention, demonstrating the substantial clinical and economic burden associated with the disease [5].

Unlike true fungi, *Pythium insidiosum* belongs to the oomycete group, presenting distinct biological characteristics, such as the production of zoospores responsible for infection, in addition to a cell wall composition based on cellulose, β -glucans, and hydroxypollin [1, 6]. These particularities directly influence the pathogenesis and response to treatment, making the disease difficult to manage clinically [1].

Pythiosis manifests predominantly in cutaneous form in horses, characterized by exuberant granulomatous lesions and the presence of necrotic structures called “kunkers”, resulting from an intense local inflammatory response [3, 4].

Despite advances in knowledge about the clinical and etiological aspects of the disease, there are still significant gaps in understanding the immunological mechanisms involved in the progression of pythiosis. Evidence indicates that the host's immune response plays a central role in pathogenesis, influencing both the persistence of the agent and the severity of the lesions [2, 5].

Therefore, this study aims to address the main biological and infectious aspects of *Pythium insidiosum*, with emphasis on the immunopathogenesis of equine pythiosis, correlating the immune response with clinical manifestations and discussing the role of immunotherapy as a therapeutic strategy in controlling the disease.

DEVELOPMENT

Equine pythiosis involves a complex interaction between the etiological agent, environmental factors, and the host's immune response, which determines the evolution and severity of the lesions. Understanding these mechanisms is essential for understanding the pathogenesis of the disease, as well as its clinical manifestations and associated therapeutic difficulties.

In this context, the main biological and infectious aspects of *Pythium insidiosum*, the immunopathogenic mechanisms involved in the host response, the correlation

between immune response and clinical signs, as well as immunotherapeutic strategies and implications for disease control in horses will be addressed below.

Biological aspects and determinants of infection.

Infection by *Pythium insidiosum* occurs predominantly when biflagellate zoospores present in contaminated aquatic environments come into contact with areas of cutaneous discontinuity, including abrasions, traumatic wounds, or microlesions. Following adhesion to the host tissue, the zoospores undergo encystment and germination, producing invasive hyphae capable of penetrating and colonizing adjacent tissues. Such environments include floodplains, marshes, ponds, wetlands, and areas with dense aquatic vegetation, which provide favorable ecological conditions for the maintenance of the oomycete life cycle. The incidence of infection increases during rainy seasons, when elevated humidity and water accumulation enhance zoospore production, dispersion, and host exposure [1, 2].

Pythium insidiosum is an aquatic oomycete belonging to the kingdom *Straminipila*, phylogenetically distinct from true fungi. Its taxonomic classification reflects important structural, biochemical, and reproductive differences that directly influence pathogenicity, diagnosis, and therapeutic response. Among its most distinctive biological characteristics is the production of biflagellate zoospores, which display active motility in aqueous environments and are capable of chemotactic migration toward damaged tissues, where they initiate the infectious process. Its distribution is predominantly in tropical and subtropical regions, where high temperatures and humidity favor its biological cycle and environmental maintenance [2].

From a molecular point of view, the microorganism is classified into three main clades based on phylogenetic analyses of ITS, IGS regions and mitochondrial genes such as COX2 and $\text{exo-1,3-}\beta$ -glucanase. These clades are called ATH (Clade I), BTH (Clade II) and CTH (Clade III), presenting distinct geographical distribution, with Clade I predominating in the Americas, Clade II in Asia and Australia and Clade III in specific regions of Thailand and the United States [7].

Recently, phylogenomic and proteomic analyses, including MALDI-ToF, have led to the description of related species, such as *Pythium periculosum*, expanding the taxonomic complexity of the genus and reinforcing the need for accurate diagnostic methods for differentiation between species [7].

Following tissue invasion, *Pythium insidiosum* develops an infiltrative growth pattern characterized by progressive extension through the dermis and subcutaneous tissues, resulting in extensive local destruction and chronic inflammatory reactions, associated with the production of lytic enzymes such as enolase and other proteins involved in cell adhesion and extracellular matrix degradation. The secretion of extracellular enzymes and adhesion-associated



Fig. Skin lesion on a horse limb consistent with pythiosis. An ulcerative, granulomatous lesion with a proliferative appearance is observed, with irregular and poorly defined borders, associated with the formation of exuberant granulation tissue. Serosanguineous exudate and an infiltrative appearance are noted (Source: Adapted from Pitiose.com.br)

Рис. Поражение кожи на конечности лошади, характерное для питиоза. Наблюдается язвенное, гранулематозное поражение с пролиферативным видом, с неровными и плохо очерченными краями, сопровождающееся образованием обильной грануляционной ткани. Отмечается серозно-кровянистый экссудат и инфильтративный характер поражения (источник: Adapted from Pitiose.com.br)

proteins facilitates extracellular matrix degradation, tissue penetration, and local dissemination of the pathogen, contributing to the development of extensive fibrogranulomatous lesions frequently associated with necrosis and kunker formation [2, 6].

Immunopathogenesis. The host response to *Pythium insidiosum* infection begins with the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by pattern-recognition receptors (PRRs) expressed on innate immune cells, including macrophages, neutrophils, and dendritic cells, triggering a local inflammatory response. Despite the rapid recruitment of inflammatory cells, innate immune mechanisms often fail to completely eliminate the pathogen, allowing viable hyphae to persist within affected tissues and promoting disease progression [2, 5].

Following the activation of innate immunity, CD4⁺ T lymphocytes may differentiate into distinct effector subsets, particularly T-helper 1 (Th1) and T-helper 2 (Th2) cells, whose balance plays a fundamental role in determining the host response to infectious agents [5, 8]. Th1 responses are characterized by the production of cytokines such as interferon-gamma (IFN- γ) and interleukin-2 (IL-2), which promote macrophage activation, stimulate cell-mediated immunity, and enhance the host's ability to eliminate invading pathogens [5, 9].

In contrast, Th2 responses are associated with the production of cytokines such as IL-4, IL-5, and IL-13, which stimulate humoral immunity, antibody production, and eosinophil recruitment, and are commonly associated with allergic and antiparasitic responses [5, 8].

In equine pythiosis, the adaptive immune response is predominantly polarized toward a Th2 profile, resulting in

increased production of IL-4, IL-5, and IL-13, which stimulate eosinophil activation and recruitment. This immune response is directly associated with eosinophilic inflammation, granuloma formation, and the persistence of *Pythium insidiosum* within affected tissues. Although it contributes to pathogen containment, it is generally considered insufficient for complete pathogen elimination [5].

Eosinophilic infiltration represents a hallmark of equine pythiosis and plays a central role in disease immunopathogenesis. Activated eosinophils release cytotoxic granule proteins, reactive oxygen species, and pro-inflammatory mediators which, despite contributing to the host defense response, are largely responsible for extensive tissue damage, necrosis, and the formation of characteristic structures known as kunkers [5].

Furthermore, the inability to establish an effective Th1-mediated immune response limits macrophage activation and compromises efficient pathogen elimination. This immunological deviation favors immune evasion by the pathogen and contributes to its chronic persistence within host tissues [4, 5].

Consequently, immunotherapy has been proposed as an immunomodulatory strategy aimed at redirecting the immune response from a predominantly Th2 profile, considered non-protective, toward a more effective Th1-mediated response. This shift promotes the activation of cellular mechanisms involved in infection control and enhances the host's ability to eliminate the infectious agent [5, 9].

Correlation between immune response and clinical manifestations of equine pythiosis. The marked eosinophilic inflammatory response contributes directly to the formation of kunkers, which consist of necrotic concretions composed of eosinophilic debris, collagen fibers, inflammatory cells, and hyphal fragments embedded within areas of chronic granulomatous inflammation [2, 4]. The presence of these structures is considered a characteristic pathological and clinical feature of equine pythiosis.

The clinical signs of equine pythiosis are mainly characterized by ulcerative, granulomatous, and progressively growing cutaneous and subcutaneous lesions, most frequently located on the distal extremities of the limbs, as shown in Figure, and in the ventral thoracoabdominal region, areas most exposed to prolonged contact with water contaminated by zoospores of *Pythium insidiosum* [10].

The lesions have a tumor-like appearance, irregular borders, a fistulous tract, and serosanguineous, hemorrhagic, or mucopurulent discharge, frequently associated with the presence of granular necrotic material, kunkers, considered a characteristic finding of the disease [11].

Severe pruritus associated with eosinophilic inflammation frequently induces self-trauma and repetitive mechanical irritation by the animal, resulting in lesion enlargement, delayed healing, and increased susceptibility to secondary bacterial contamination.

In advanced or prolonged cases, local invasion may extend to deeper anatomical structures, including fascia, tendons, muscles, lymphatic vessels, and, less frequently, internal organs, significantly worsening prognosis and therapeutic outcome [11].

Immunotherapy and strategies for modulating the immune response. Treatment of pythiosis in animals is highly complex and is often hampered by late diagnosis,

which negatively impacts the prognosis. In general, the prognosis is directly related to factors such as the duration of the disease, the location and extent of the lesions, as well as the animal's overall condition, including nutritional status and the host's immune response [5].

The therapeutic approach of choice, in most cases, consists of extensive surgical debridement, provided it is technically feasible [1, 3]. Recent evidence reinforces that early surgical intervention, associated with complete removal of the affected tissue with pathogen-free margins, is crucial for therapeutic success and for reducing recurrence rates [4, 5]. However, the application of this technique may be limited depending on the location of the lesions, especially in limbs, where there is a higher risk of complications such as hemorrhages, requiring the use of complementary techniques such as cauterization, vascular ligation, and compressive bandages. In these cases, healing usually occurs by secondary intention [11].

Regarding drug therapy, several drugs with antifungal action have been used, including amphotericin B, itraconazole, fluconazole, ketoconazole, terbinafine, and potassium iodide. However, these treatments have limited efficacy, especially due to the biological characteristics of *Pythium insidiosum*, which does not have ergosterol in its plasma membrane, the main target of most antifungals, which compromises the action of these drugs. In addition, therapeutic protocols generally require prolonged administration and can cause significant adverse effects, including nephrotoxicity, making it necessary to monitor biochemical parameters such as urea and creatinine [12, 13].

As an alternative, the use of amphotericin B by regional intravenous infusion has been described, especially in lesions located on limbs. When combined with surgical removal, this technique can provide better clinical outcomes and a lower incidence of systemic adverse effects compared to conventional systemic administration [11].

Owing to the limited efficacy of conventional pharmacological therapies against *Pythium insidiosum*, immunotherapy has become an important alternative therapeutic approach aimed at enhancing host immune mechanisms involved in pathogen clearance. The therapeutic rationale of immunotherapy is based on modulation of the host immune response, promoting a shift from the predominantly non-protective Th2 profile toward a more effective Th1-mediated cellular response associated with macrophage activation and pathogen elimination [1, 5]. Recent studies indicate that this approach shows better results when associated with surgical intervention [5, 11].

In Brazil, immunotherapy has been used for over two decades, with the commercial formulation Pitium-Vac®, developed by the Mycological Research Laboratory (LAPEMI-UFSM) in partnership with EMBRAPA Pantanal, standing out. This vaccine is composed of extracts of *Pythium insidiosum* hyphae subjected to sonication, with the aim of inducing a more effective immune response against the agent. In general, its use occurs in association with other therapeutic approaches, such as surgical excision and antibiotic therapy, aiming to enhance clinical results [13].

Despite exhibiting variable efficacy, immunotherapy, when combined with other therapeutic modalities, has demonstrated improved clinical outcomes. Thus, the most effective approach currently is based on a combination of early surgical intervention, immunotherapy, and appropriate clinical management, reinforcing the

importance of integrated strategies for the control of equine pythiosis [5, 11].

Control and prevention strategies. Control of equine pythiosis is directly related to the interaction between environmental factors and the host's immune response. Exposure to flooded environments, especially in tropical regions, represents one of the main risk factors for infection [1, 2].

Preventive measures are primarily based on environmental and sanitary management practices, including minimizing animal exposure to flooded areas, implementing measures to reduce prolonged contact with stagnant water, and promptly treating traumatic skin injuries that may serve as portals of entry for infective zoospores [1].

The therapeutic difficulty, associated with the predominantly ineffective immune response, reinforces the need for strategies based on immunological modulation, as well as the development of new therapeutic approaches aimed at controlling the disease [4, 5].

In humans, the use of personal protective equipment, such as boots, gloves and goggles, is recommended, in addition to the adoption of educational measures in endemic areas, aiming to reduce the risk of exposure to the agent [1].

Diagnosis. The diagnosis of equine pythiosis caused by *Pythium insidiosum* remains challenging, with microbiological culture being the traditional method, although it presents low sensitivity, slowness, and dependence on adequate sample conditions and laboratory expertise.

Immunological methods have been proposed as an alternative, but they present important limitations, such as difficulty in differentiating active infection from previous exposure, low sensitivity in localized forms, and the absence of commercially available tests [14].

Currently, molecular methods based on nucleic acids represent the most reliable approach, allowing direct detection of the agent's DNA with high sensitivity and specificity [15]. Within this group, polymerase chain reaction (PCR) is the main method used, including its variants: conventional PCR, nested PCR, multiplex PCR, and real-time PCR, which progressively increase diagnostic sensitivity, allow genotyping, and reduce the risk of contamination [16, 17].

Furthermore, isothermal techniques such as helicase-dependent amplification and loop-mediated isothermal amplification have gained prominence for dispensing with a thermocycler, exhibiting good sensitivity, and enabling application in resource-limited environments [10, 18, 19].

More recently, next-generation sequencing and metagenomic approaches have emerged as advanced tools, allowing non-targeted identification of the agent even in complex cases, although their use is still limited by high cost and the requirement for specialized infrastructure [20, 21, 22].

In general, the diagnosis of equine pythiosis is based on the integration of clinical, histopathological findings and, mainly, molecular methods, which currently represent the most reliable standard for confirming the disease.

CONCLUSION

Equine pythiosis represents a highly relevant infectious disease in veterinary medicine, especially in endemic regions, due to its substantial morbidity and the frequent need for prolonged and often invasive therapeutic

approaches. Understanding the biological aspects of *Pythium insidiosum* and the immunopathogenic mechanisms involved is essential for disease management. The predominance of a Th2-polarized immune response, characterized by elevated production of IL-4, IL-5, and IL-13 and marked eosinophilic infiltration, contributes to tissue persistence of *Pythium insidiosum* by failing to activate cellular immune mechanisms required for efficient pathogen elimination. In this context, immunotherapy stands out as a promising strategy by promoting the modulation of the immune response to a more effective Th1 profile in eliminating the pathogen. Despite this, treatment still has limitations, often being prolonged and with variable efficacy. Therefore, early diagnosis and control of environmental factors are fundamental. Key perspectives include the need for further research into the immunological mechanisms of the disease, the development of new immunotherapeutic approaches, and the optimization of therapeutic protocols, aiming for greater effectiveness in controlling equine pythiosis.

REFERENCES

1. De Moraes Gímenes Bosco S., Chechi J. L., de Paz G. S., Krajaejun T. Pythiosis. In: *Recent Trends in Human and Animal Mycology*. Ed. by K. Singh, N. Srivastava. Singapore: Springer; 2019; 3–26. https://doi.org/10.1007/978-981-13-9435-5_1
2. Santurio J. M., Alves S. H., Pereira D. B., Argenta J. S. Pitiose: uma micose emergente. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2018; 34 (1): 1–14. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.15060> (in Portuguese)
3. De Moraes Gímenes Bosco S., Hussni C. A., Santurio J. M., Bagagli E. Pitiose. In: *Megid J., Ribeiro M. G., Paes A. C. Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia*. Rio de Janeiro: Roca; 2016; 946–957 (in Portuguese).
4. Di Filippo P. A., Lemos G. B., Meireles M. A. D., Coutinho I. D. S., Gobbi F. P., Godinho A. B. F. R. Clinical and anatomopathological aspects of boné lesions secondary to *Pythium insidiosum* in horses. *Revista Acadêmica Ciência Animal*. 2020; 18:e18502. <https://doi.org/10.7213/2596-2868.2020.18502>
5. Yolanda H., Krajaejun T. History and perspective of immunotherapy for pythiosis. *Vaccines*. 2021; 9 (10):1080. <https://doi.org/10.3390/vaccines9101080>
6. Chechi J. L., Franckin T., Barbosa L. N., Alves F. C. B., Leite A. L., Buzalaf M. A. R., et al. Inferring putative virulence factors for *Pythium insidiosum* by proteomic approach. *Medical Mycology*. 2019; 57 (1): 92–100. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx166>
7. Ribeiro T. C., Weiblen C., de Azevedo M. I., de Avila Botton S., Robe L. J., Pereira D. I., et al. Microevolutionary analyses of *Pythium insidiosum* isolates of Brazil and Thailand based on *exo-1,3-β-glucanase* gene. *Infection, Genetics and Evolution*. 2017; 48: 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.11.020>
8. Chechi J. L., Rotchanapreeda T., da Paz G. S., Prado A. C., Oliveira A. L., Vieira J. C. S., et al. Prospecting biomarkers for diagnostic and therapeutic approaches in pythiosis. *Journal of Fungi*. 2021; 7 (6):423. <https://doi.org/10.3390/jof7060423>
9. Tondolo J. S. M., Loreto E. S., de Jesus F. P. K., Ledur P. C., Verdi C. M., Santurio J. M. Immunotherapy based on *Pythium insidiosum* mycelia drives a Th1/Th17 response in mice. *Medical Mycology*. 2020; 58 (8): 1120–1125. <https://doi.org/10.1093/mmy/myaa023>
10. Asuncion M. S., Huguet-Tapia J. C., Braun E. L., Ortiz-Urquiza A., Keyhani N. O., Goss E. M. Whole genome sequence of the emerging oomycete pathogen *Pythium insidiosum* strain CDC-B5653 isolated from an infected human in the USA. *Genomics Data*. 2016; 7: 60–61. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.11.019>
11. Chitasombat M. N., Jongkhajornpoong P., Lekhanont K., Krajaejun T. Recent update in diagnosis and treatment of human pythiosis. *PeerJ*. 2020; 8:e8555. <https://doi.org/10.7717/peerj.8555>
12. Pereira D. I. B., Botton S. A., Ianiski L. B., Braga C. Q., Maciel A. F., Melo L. G., et al. Equidae pythiosis in Brazil and the world: a systematic review of the last 63 years (1960–2023). *Brazilian Journal of Microbiology*. 2024; 55 (3): 2969–2981. <https://doi.org/10.1007/s42770-024-01435-6>
13. Rujirawat T., Sridapan T., Lohnoo T., Yingyong W., Kumsang Y., Sae-Chew P., et al. Single nucleotide polymorphism-based multiplex PCR for identification and genotyping of the oomycete *Pythium insidiosum* from humans, animals and the environment. *Infection, Genetics and Evolution*. 2017; 54: 429–436. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.08.004>
14. Green M. R., Sambrook J. Nested polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*. 2019; (2): 436–456. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095182>
15. Htun Z. M., Rotchanapreeda T., Rujirawat T., Lohnoo T., Yingyong W., Kumsang Y., et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for identification of *Pythium insidiosum*. *International Journal of Infectious Diseases*. 2019; 101: 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.09.1430>
16. Worasilchai N., Chaumpluk P., Chakrabarti A., Chindamporn A. Differential diagnosis for pythiosis using thermophilic helicase-dependent DNA amplification and restriction fragment length polymorphism (tHDA-RFLP). *Medical Mycology*. 2018; 56 (2): 216–224. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx033>
17. Wong Y.-P., Othman S., Lau Y.-L., Radu S., Chee H.-Y. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*. 2018; 124 (3): 626–643. <https://doi.org/10.1111/jam.13647>
18. Ferone M., Gowen A., Fanning S., Scannell A. G. M. Microbial detection and identification methods: bench top assays to omics approaches. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2020; 19 (6): 3106–3129. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12618>
19. Krajaejun T., Kittichotirat W., Patumcharoenpol P., Rujirawat T., Lohnoo T., Yingyong W. Whole genome sequencing data of *Pythium insidiosum* strain CBS 101555 isolated from a horse with pythiosis in Brazil. *BMC Research Notes*. 2018; 11:880. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3968-3>
20. Sridapan T., Krajaejun T. Nucleic acid-based detection of *Pythium insidiosum*: a systematic review. *Journal of Fungi*. 2023; 9 (1):27. <https://doi.org/10.3390/jof9010027>
21. Cardona-Álvarez J., Vargas-Viloria M., Patarroyo-Salcedo J. Pythiosis cutánea en equinos tratados con acetona de triamcinolona. Parte 1. Caracterización clínica. *Revista MVZ Córdoba*. 2016; 21 (3): 5511–5524. <https://doi.org/10.21897/rmvz.825> (in Spanish)
22. Pordeus N. M., Silva W. C., Reis A. S. B. Tratamento de pitiose equina: uma revisão. *Multidisciplinary Reviews*. 2019; 2:e2019027. <https://doi.org/10.29327/multi.2019027> (in Portuguese)

Поступила в редакцию / Received 22.05.2026

Поступила после рецензирования / Revised 08.07.2026

Принята к публикации / Accepted 06.08.2026

INFORMATION ABOUT THE AUTHOR / ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ

Júlia A. Silva Pinheiro, Undergraduate Student, Centro Universitário UNA, Campus Linha Verde, Faculdade de Medicina Veterinária, Belo Horizonte, Brazil; <https://orcid.org/0009-0003-4707-9000>, juliapinheiro1306@gmail.com

Júlia A. Silva Pinheiro, студент бакалавриата, Университетский центр UNA, кампус «Зеленая линия», факультет ветеринарной медицины, Белу-Оризонти, Бразилия; <https://orcid.org/0009-0003-4707-9000>, juliapinheiro1306@gmail.com

Contribution of the author: review concept, exploration and analysis, article draft preparation and writing.

Вклад автора: концепция обзора, проведение поисково-аналитической работы, подготовка и написание статьи.



<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-241-251>
УДК 619:616.98:579.834.115:636.7(048)



Этиология и патогенез лептоспироза: общие закономерности и особенности проявления у собак (обзор)

Д. А. Быковцева, С. В. Щербинин, Т. С. Галкина, К. Н. Груздев

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), ул. Гвардейская, 6, мкр. Юрьевец, г. Владимир, 600901, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Лептоспироз – инфекционная болезнь, опасная для человека и животных. Ключевым звеном в передаче инфекции человеку являются собаки. На территории Российской Федерации для собак актуальны серогруппы *Canicola* и *Icterohaemorrhagiae* как наиболее вирулентные, но возможно заражение и другими серогруппами *Leptospira* spp. Тяжесть болезни определяется факторами патогенности лептоспир. Из-за зоонозного характера лептоспироза вакцинация собак – элемент санитарно-эпидемиологического благополучия. Регулярная иммунизация снижает риск заражения людей и предотвращает вспышки. При выборе вакцин учитывают ограниченность перекрестной защиты между серогруппами, предпочитая поливалентные препараты. Однако существующие вакцины не обеспечивают надежной защиты из-за неактуального состава серогрупп. Персистенция возбудителя в организме животных и его выделение в среду снижают эффективность профилактики. Необходим комплексный подход к предотвращению заражения собак и передачи патогена человеку.

Цель исследования. Актуализировать и систематизировать данные по лептоспирозу собак, вызываемому *Leptospira interrogans*.

Материалы и методы. Материалом для аналитического исследования служили научные публикации зарубежных и отечественных авторов, размещенные в библиографических базах данных eLibrary, КиберЛенинка, PubMed, Science Direct, Google Scholar и др.

Результаты. В аналитическом обзоре приведены актуальные данные об эпизоотической и эпидемиологической ситуации по лептоспирозу в Российской Федерации, рассмотрены свойства возбудителя, представлена классификация лептоспир, описаны клинические и патолого-анатомические признаки болезни. Охарактеризованы применяемые в ветеринарной практике современные методы лабораторной диагностики, лечения и профилактики лептоспироза собак, обозначены актуальные проблемы.

Заключение. Лептоспироз широко распространен среди собак. Лептоспиры способны адаптироваться и персистировать в организме-хозяине, вызывая хроническое течение болезни, что угрожает здоровью людей и животных. Сложность патогенеза, многообразие серотипов и внутриклеточная персистенция затрудняют элиминацию возбудителя. Современные методы диагностики и лечения требуют совершенствования. Необходимы исследования для разработки эффективных схем профилактики и терапии, включая новые подходы к специфической профилактике у собак. Таким образом, лептоспироз остается актуальной проблемой ветеринарной медицины, требующей комплексного подхода.

Ключевые слова: обзор, лептоспироз, лептоспиры, спирохеты, собаки

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

Для цитирования: Быковцева Д. А., Щербинин С. В., Галкина Т. С., Груздев К. Н. Этиология и патогенез лептоспироза: общие закономерности и особенности проявления у собак (обзор). *Ветеринария сегодня*. 2026; 15 (3): 241–251. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-241-251>

Конфликт интересов: Груздев К. Н. является главным редактором журнала «Ветеринария сегодня», но никакого отношения к решению опубликовать эту статью не имеет. Рукопись прошла принятую в журнале процедуру рецензирования. Об иных конфликтах интересов авторы не заявляли.

Для корреспонденции: Быковцева Дарья Андреевна, аспирант, ветеринарный врач лаборатории профилактики болезней мелких домашних животных ФГБУ «ВНИИЗЖ», ул. Гвардейская, 6, мкр. Юрьевец, г. Владимир, 600901, Россия, bykovceva@arriah.ru

Etiology and pathogenesis of leptospirosis: general patterns and features of manifestation in dogs (review)

Daria A. Bykovtseva, Sergey V. Shcherbinin, Tatyana S. Galkina, Konstantin N. Gruzdev

Federal Centre for Animal Health, ul. Gvardeyskaya, 6, Yur'evets, Vladimir 600901, Russia

ABSTRACT

Introduction. Leptospirosis is an infectious disease hazardous to both humans and animals. Dogs serve as a key link in transmitting the infection to humans. Within the Russian Federation, the *Canicola* and *Icterohaemorrhagiae* serogroups are of primary relevance for dogs as the most virulent ones, although infection with other *Leptospira* spp. serogroups remains possible. The severity of the disease is determined by the pathogenicity factors of leptospires. Due to the zoonotic nature of leptospirosis, canine vaccination is a vital element of sanitary and epidemiological freedom. Regular immunization reduces the risk of human infection and prevents outbreaks. When selecting vaccines, the limited cross-protection between serogroups should be considered, with polyvalent products being preferred. However, existing vaccines do not provide reliable protection due to outdated serogroup compositions. The persistence of the causative agent within the animal host and its shedding into the environment diminish the effectiveness of prevention. A comprehensive approach is required to prevent canine infection and subsequent causative agent transmission to humans.

Objective. To update and systemize data on canine leptospirosis caused by *Leptospira interrogans*.

Materials and methods. Scientific publications by foreign and domestic authors available in bibliographic databases such as eLibrary, CyberLeninka, PubMed, Science Direct, Google Scholar, and others served as the material for this analytical study.

Results. This analytical review presents up-to-date data on the epizootic and epidemiological situation regarding leptospirosis in the Russian Federation. It examines the properties of the causative agent, presents the classification of leptospires, and describes the clinical and post-mortem lesions of the disease. Furthermore, the review characterizes modern methods of laboratory diagnosis, treatment, and prevention of canine leptospirosis currently applied in veterinary practice, and outlines existing challenges.

Conclusion. Leptospirosis is widespread in dogs. Leptospires are capable of adapting and persisting in the host organism, causing a chronic course of the disease, which poses a threat to human and animal health. The complexity of pathogenesis, the diversity of serotypes and intracellular persistence complicate the eradication of the causative agent. Current diagnostic and treatment methods require improvement. Research is needed to develop effective prevention and therapy protocols, including new approaches to specific prevention in dogs. Thus, leptospirosis remains a pressing issue in veterinary medicine requiring a comprehensive approach.

Keywords: review, leptospirosis, leptospires, spirochetes, dogs

Acknowledgements: The study was funded by the Federal Centre for Animal Health as a part of research activities "Animal Disease Freedom".

For citation: Bykovtseva D. A., Shcherbinin S. V., Galkina T. S., Gruzdev K. N. Etiology and pathogenesis of leptospirosis: general patterns and features of manifestation in dogs (review). *Veterinary Science Today*. 2026; 15 (3): 241–251. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-241-251>

Conflict of interests: Gruzdev K. N. is the editor-in-chief of the "Veterinary Science Today" journal, but was not involved into the decision making process related to this paper publication. The manuscript has passed the review procedure accepted in the journal. The authors did not declare any other conflicts of interests.

For correspondence: Daria A. Bykovtseva, Postgraduate Student, Veterinarian, Laboratory for Pets Diseases Prevention, Federal Centre for Animal Health, ul. Gvardeyskaya, 6, Yur'evets, Vladimir 600901, Russia, bykovtseva@arriah.ru

ВВЕДЕНИЕ

Лептоспироз – один из наиболее распространенных в мире зоонозов, который из-за высокой летальности и тяжести клинического проявления представляет серьезную угрозу для здоровья человека и животных [1]. По опубликованным данным, на 2022 г. идентифицировано 68 видов *Leptospira*, из них по меньшей мере 12 патогенных и 4 сапрофитных вида с более чем 300 патогенными серовариантами лептоспир [2]. Данные цифры постоянно растут, регистрируются все новые штаммы, серовары, которые объединяются в серогруппы [3].

Ежегодно лептоспирозом заболевают свыше миллиона человек, а количество смертей может составлять от 20 до 100 тыс. [4]. Подобные цифры сравнимы по ущербу с бешенством – другим смертельно опасным зоонозом [5]. Некоторые авторы сравнивают значимость лептоспироза для здоровья человека и животных с туберкулезом и бруцеллезом [6].

Ключевой этап в разработке профилактических препаратов связан с фундаментальными работами В. В. Ананьина¹, заложившими основу для систематизации знаний об этиологии и эпидемиологии лептоспирозов, включая патогенность различных серотипов *Leptospira interrogans*. В последующие десятилетия акцент сместился на создание поливалентных вакцин, учитывающих региональную специфику циркуляции лептоспир. Значительный вклад в изучение этиологической структуры заболевания на юге России внесли исследования И. А. Болоцкого и соавт., выявивших доминирующие серотипы на Северном Кавказе и обосновавших необходимость адаптации профилактических схем [7].

Впервые вакцинация против лептоспироза инактивированными препаратами была проведена в 1916 г. [8]. Значительный прогресс в профилактике лептоспироза достигнут благодаря комплексному

подходу, описанному в монографии Ю. А. Малахова и соавт.², где рассмотрены принципы создания и применения инактивированных вакцин, а также схемы серологического мониторинга вакцинированных животных. Несмотря на ранее разработанные средства специфической профилактики и проводимые мероприятия, лептоспироз остается повсеместно распространенной болезнью, поражающей многие виды животных [6]. При этом хроническое течение лептоспироза было отмечено даже у вакцинированных особей [9]. На фоне положительной динамики снижения случаев лептоспироза у сельскохозяйственных животных за последние несколько лет особую актуальность в современных условиях приобретают антропургические очаги с доминирующим источником инфекции – собаками³ [10]. Это обуславливает необходимость разработки актуальных вакцин для оптимизации профилактических мероприятий при лептоспирозе [6].

Изучение особенностей течения лептоспироза у собак, совершенствование методов его диагностики и профилактики имеет важное значение для снижения экономических потерь, связанных с лечением и профилактикой заболевания, а также для минимизации риска заражения людей [11]. Современные профилактические стратегии базируются на данных об эпизоотологии и патогенезе лептоспироза, систематизированных в работах Г. Л. Соболевой и соавт. [12]. Учитывая зоонозный характер болезни и ее способность к широкому распространению, данная тема представляет значительный интерес для ветеринарной медицины и общественного здравоохранения.

Новизна работы заключается в актуализации сведений о ситуации по лептоспирозу (среди животных и людей) в России, что позволит повысить эффективность

¹ Лептоспирозы людей и животных. Под ред. проф. В. В. Ананьина. М.: Медицина; 1971. 352 с.

² Малахов Ю. А., Панин А. Н., Соболева Г. Л. Лептоспироз животных. Ярославль: ДИА-пресс; 2000. 584 с.

³ <https://центр-ветеринарии.рф>

Таблица
Классификация патогенных лептоспир
Table
Classification of pathogenic leptospires

Таксономическая принадлежность	Серогруппа	Восприимчивые виды животных
<i>Leptospira interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Крупный и мелкий рогатый скот, собаки, кошки, крысы (серая и черная)
	Pomona	Свиньи, лошади, полевые мыши, мелкий рогатый скот, приматы, змеи, олени
	Canicola	Собаки, овцы, свиньи, лошади
	Hebdomadis	Грызуны, крупный рогатый скот, слоны
<i>Leptospira interrogans</i> <i>Leptospira kirschneri</i>	Grippotyphosa	Крупный рогатый скот, собаки, кошки, серые полевки
<i>Leptospira kirschneri</i>	Autumnalis	Ушастые ежи
<i>Leptospira borgpetersenii</i> <i>Leptospira interrogans</i>	Sejroe	Крупный рогатый скот
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	Javanica	Землеройки-бурозубки, полевые мыши
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	Tarassovi	Крупный рогатый скот, грызуны, свиньи

профилактических мер. Также представлены данные о клинических проявлениях, патоморфологических изменениях и особенностях течения болезни у собак. В исследовании приведены сравнения современных методов диагностики (серологических и молекулярно-биологических), систематизированы рекомендации о вакцинопрофилактике.

Целью работы является анализ и систематизация накопленных данных по лептоспирозу собак, вызываемому *Leptospira interrogans*. Данный обзор раскрывает особенности природно-очаговой болезни, являющейся опасной для здоровья и жизни человека, что представляет интерес для создания безопасной для человека среды, поскольку животные-компаньоны являются одними из главных звеньев в распространении важнейших зоонозов.

ЭПИЗООТИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ

В период с 2000 по 2024 г. на территории России зарегистрировано более 13 тыс. случаев лептоспироза у людей. С 2012 г. инфекция выявляется во многих федеральных округах (в 61 из 89 субъектов Российской Федерации), в том числе в Донецкой Народной Республике и Херсонской области⁴ [2].

На территории Российской Федерации циркулируют патогенные лептоспиры, относящиеся к трем видам: *interrogans*, *kirschneri*, *borgpetersenii*. Для изучения эпизоотологии и этиологии лептоспироза животных в России наибольшее значение имеют серогруппы Pomona, Tarassovi, Hebdomadis, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Canicola. Согласно таксономической классификации лептоспир, утвержденной в 1993 г. Международным подкомитетом, серогруппа Hebdomadis дифференцирована на три подгруппы: Hebdomadis, Mini и Sejroe. В Российской Федерации эпидемиологический надзор фиксирует циркуляцию исключительно лептоспир серогруппы Sejroe. В редких

случаях встречается Australis, но эта серогруппа не получила широкого распространения в нашей стране [6, 12].

Различные серогруппы возбудителя демонстрируют неодинаковую тропность к теплокровным организмам, не ограничиваясь одним хозяином. Icterohaemorrhagiae характеризуется широким спектром видового поражения, включая представителей крупного и мелкого рогатого скота, а также синантропных и домашних животных; Grippotyphosa циркулирует преимущественно среди парнокопытных и представителей семейства кошачьих с возможностью инфицирования приматов; Pomona отличается способностью к инфицированию широкого спектра позвоночных, включая представителей отряда парнокопытных и хищных; Canicola проявляет выраженную тропность к семейству псовых с возможностью инфицирования представителей крупного рогатого скота и парнокопытных; Tarassovi циркулирует в большей степени в популяциях крупного рогатого скота и грызунов с потенциальной патогенностью для человека; Hebdomadis демонстрирует способность к инфицированию преимущественно крупного рогатого скота и грызунов, также зарегистрированы случаи заражения человека и слонов (табл.) [6, 12, 13, 14].

В последнее время в Российской Федерации участились случаи заражения людей лептоспирами, в особенности серогрупп Icterohaemorrhagiae, Pomona, а также Grippotyphosa и Canicola [12, 13, 15, 16]. Аналогичная ситуация складывается с инфицированием животных *Leptospira* серогруппы Icterohaemorrhagiae вследствие постоянных контактов между переносчиками – грызунами и домашними животными. Собаки чаще являются носителями лептоспир серовара Canicola, чем Icterohaemorrhagiae, а также основным источником заражения⁵ [6, 12, 17, 18]. Синантропные

⁵ Покровский В. И., Пак С. Г., Брико Н. И., Данилкин Б. К. Инфекционные болезни и эпидемиология: учебник. 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007. 816 с.

⁴ <https://центр-ветеринарии.рф>



Рис. *Leptospira* spp. под объективом темнопольного электронного микроскопа [1]

Fig. *Leptospira* spp. under a dark-field microscope [1]

грызуны выступают главными переносчиками и участвуют в заражении людей, выделяя лептоспиры в высоких концентрациях (10^7 /мл мочи) через несколько месяцев после инфицирования. Полевые мыши и крысы являются бессимптомными носителями *Leptospira*, сохраняющихся в почках животных [19].

Передача возбудителя лептоспироза происходит, как правило, алиментарным путем. Также существует и вертикальная передача – через плаценту, с молоком или при коитусе [20].

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛЕПТОСПИР

Возбудитель лептоспироза относится к роду *Leptospira*, принадлежит к семейству *Leptospiraceae* порядку *Spirochaetales* [1]. Лептоспиры – строгие аэробы, грамотрицательные, тонкие, спирально закрученные бактерии (спирохеты), с двойной мембраной. Длина варьируется от 6 до 15 мкм, диаметр – 0,1–0,25 мкм. Геном представлен двумя кольцевидными хромосомами, размер которых зависит от варианта и состоит от 3,9 до 4,6 млн пар нуклеотидов [11].

Патогенные штаммы, выделенные от млекопитающих, морфологически скручены более плотно, чем сапрофитные и лабораторные штаммы. В ходе серии последовательных пассажей лабораторные штаммы способны изменяться. Благодаря наличию тонкой осевой линии, окруженной цитоплазматической спиралью, их заостренные концы образуют булавовидные петли – так называемые крючки (рис.). С достаточной регулярностью встречаются бескрючковые формы лептоспир, которые были выращены в лабораторных условиях с дефицитом питательных веществ [21].

Ранее было установлено, что ультраструктурные особенности лептоспир соответствуют общей организации клеточной стенки грамотрицательных бактерий: наличие наружной мембраны, во внешнем слое которой локализован липополисахарид (ЛПС), и пептидогликанового слоя, расположенного в промежуточном периплазматическом пространстве [21]. Пептидогликановый слой у этих бактерий связан с цитоплазматической, а не с наружной мембраной, что является уникальным для спирохет. Близость расположения цитоплазматической мембраны к клеточной стенке у лептоспир напоминает строение грамположительных бактерий [22]. В состав пептидогликана входит дисахарид, трипептид и сшитый димер. Доля сшитого димера отличается у различных штаммов [23]. ЛПС, входящие в состав внешней мембраны, имеют мозаичную структуру и являются диффузными барьерами, участвующими в поглощении питательных веществ [24]. ЛПС – это эндотоксин, содержащийся в мембранах грамотрицательных бактерий, являющийся

основным антигеном и активирующий Toll-подобные рецепторы 2-го и 4-го типов (TLR2 и TLR4) в клетках хозяина, которые индуцируют выработку и созревание антигенпрезентирующих клеток [25]. Слой ЛПС у спирохет *L. interrogans* составляет 9,2 нм, а у *L. biflexa* – 6 нм [21]. Лептоспиры, по сравнению с другими грамотрицательными бактериями, характеризуются низкой эндотоксичностью [25].

Описано несколько факторов вирулентности лептоспир: О-антигены, Н-антигены, ферменты и экзотоксины [25]. Антигенные эпитопы, на которые формируется специфический иммунный ответ, представлены ЛПС, а также липопroteинами, иммуноглобулин-подобными и эндостатин-подобными белками [23].

Двигательный аппарат реализован посредством полярно расположенных периплазматических жгутиков, называемых еще эндофлагеллами или локомоторными органеллами, при помощи которых лептоспиры проникают сквозь тканевые барьеры. Наличие жгутиков также определяет вирулентность данных спирохет [1, 24].

Размножение лептоспир осуществляется путем поперечного бинарного деления [25, 26]. Патогенные лептоспиры являются медленно растущими в питательной среде бактериями. Так, интервал времени для их генерации может составлять 20 ч, тогда как у сапрофитных видов он составляет 5 ч [26, 27]. Спирохеты *Leptospira* требовательны к условиям и растут в обогащенных средах, которые дополнены сывороткой крови кролика или барана, также иногда используется сывороточный альбумин быка [28]. Для культивирования лептоспир существуют несколько видов специальных питательных сред. Они делятся на сывороточные, полусинтетические и синтетические. Для изоляции лептоспир из окружающей среды и клинических образцов, а также для получения антигенов могут использоваться среды с нормальной кроличьей сывороткой, в которых содержится высокая концентрация цианокобаламина (Ферворта – Вольфа, Стюарта, Кортоха, Флетчера, Терских, ВГНКИ). Для изоляции лептоспир и дальнейшего получения биомассы для проведения молекулярно-биологических исследований применяются среды, содержащие жирные кислоты и альбумин (Эллингхаузен – МакКалеха – Джонсона – Харриса (ЕМЖН), Эллиса, альбуминовая среда ГНКИ). Также могут использоваться свободные от белка среды (Шенберга, синтетическая безбелковая среда) [29]. В основном лептоспиры культивируют с применением специальных сывороточных и синтетических сред при pH 7,2–7,4 и температуре 25–35 °C [25].

КЛАССИФИКАЦИЯ ЛЕПТОСПИР

До 1989 г. лептоспиры подразделялись на патогенный вид *L. interrogans* и сапрофитный вид *L. biflexa* [1, 9, 12]. Сапрофитный – это вид апатогенных лептоспир, которые размножаются в окружающей среде. Патогенный – это вид лептоспир, которые поражают животных и человека, в результате выделения их из организма-хозяина способны размножаться в окружающей среде [26]. На тот момент времени, пока в распоряжении исследователей находились только серологические методы диагностики, все виды лептоспир были дифференцированы и объединены в серологические группы (серогруппы) с бесчисленным количеством серологических вариантов (сероваров) внутри серогрупп. При этом есть примечание,

что сероварианты – основная таксономическая единица, тогда как серогруппы – условное деление лептоспир [30].

С развитием молекулярной диагностики появилась классификация по так называемым геномным видам (геномовидам) лептоспир. Опытным путем выяснено, что геномовиды не соответствуют двум видам (*L. interrogans* и *L. biflexa*), поскольку патогенные и апатогенные серовары встречаются в пределах одного и того же вида, поэтому принадлежность к серогруппе или серовару не позволяла определить вид лептоспир. Более того, несколько штаммов определенного серовара демонстрировали генетическую гетерогенность, а фенотипические характеристики, ранее использовавшиеся для дифференциации двух основных видов лептоспир (*L. interrogans* и *L. biflexa*), не позволяли определять геномовиды. Таким образом, генотипирование и серотипирование представляют собой два различных и плохо коррелируемых между собой метода классификации лептоспир [31].

На распределение лептоспир на геномовиды также повлияло развитие филогенетики. Благодаря этому появились новые данные, позволяющие к двум основным кластерам рода *Leptospira*, сапрофитам (*L. biflexa*) и патогенам (*L. interrogans*), добавить третий кластер промежуточных лептоспир, которые происходят от общего предка патогенных лептоспир. Промежуточная группа имеет также название «оппортунистическая», ее представители обладают патогенностью как для человека, так и для животных [32]. Оппортунистические спирохеты *Leptospira* имеют биохимически промежуточную форму между сапрофитными и патогенными спирохетами *Leptospira* [24]. К промежуточной группе относятся такие представители, как *L. fainei*, *L. inadai*, *L. broomii*, *L. licherasiae* Matthias и *L. wolffii* Slack [32].

УСТОЙЧИВОСТЬ ЛЕПТОСПИР К ФАКТОРАМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И ДЕЗИНФЕКТАНТАМ

Лептоспиры способны адаптироваться к условиям окружающей среды, меняя вирулентность [24].

Для дезинфекции применяют осветленный раствор хлорной извести с 2%-м содержанием активного хлора, 2%-й горячий раствор едкого натра, 3%-й раствор сернокарболовой смеси, 5%-ю эмульсию дезинфекционного (фенольного) креолина, 5%-ю эмульсию нафталана, 2%-й раствор формальдегида⁶. Для профилактической и вынужденной дезинфекции можно использовать раствор бактерицидного препарата «Агрицид» в концентрации 0,55% при минимальной экспозиции 15 мин [33].

По некоторым данным, возбудитель лептоспироза погибает при взаимодействии с хлором даже при низких концентрациях (0,001 мг/л/мин) [26].

Лептоспиры – гидробионты, чувствительные к внешним факторам среды. Высушивание и солнечное излучение вызывают их гибель за 2 ч. При температуре 45 °С бактерии погибают через 45 мин, а при 70 °С – за 25–30 мин. В естественной среде лептоспиры проявляют устойчивость: в воде выживают до 30 сут, во влажной почве – до 280 сут, на продуктах питания – до 2 сут.

Температура, при которой концентрация бактерий снижается вдвое, равна 32,12–32,91 °С [26].

Природные очаги связаны с географическим ландшафтом и приурочены к влажным биотопам. Устойчивость возбудителя лептоспироза зависит от ряда факторов: pH почвы (оптимальным является нейтральный показатель), минимального содержания кислых солей, отсутствия инсоляции и наличия оптимального уровня влажности в почве [34]. Но, несмотря на это, *L. interrogans* способна выживать до 6 ч под воздействием УФ-излучения [35]. Образование биопленок путем объединения лептоспир также является одним из механизмов сохранения бактерии в окружающей среде [24].

Сапрофитные представители рода *Leptospira* способны размножаться при температуре 5–35 °С; в естественных условиях могут репродуцироваться в почве и воде, не способны инфицировать млекопитающих, но в редких случаях могут быть обнаружены в моче. Патогенные спирохеты *Leptospira* репродуцируются при температуре 20–25 °С [24]. Лептоспиры могут выживать в крови, смешанной с гепарином, при комнатной температуре до 109 сут [36].

Устойчивость патогенных лептоспир к вырабатываемым иммунными клетками хозяина активным формам кислорода возникает благодаря наличию фермента каталазы [28].

ПАТОГЕНЕЗ И КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ЛЕПТОСПИРОЗА

Инкубационный период лептоспироза у собак в среднем составляет 7–12 сут и может колебаться от 3 до 30 сут [37]. Существует панвозрастная восприимчивость у животных, однако щенки и молодые особи характеризуются повышенной чувствительностью к возбудителю. Лептоспиры обладают способностью проникать трансдермально через любые повреждения кожных покровов: открытые раны, ссадины, царапины, а также через слизистые оболочки глаз (конъюнктиву), рта, носа и гениталий⁷. Даже незначительные повреждения эпителия могут стать воротами инфекции⁸. Это связано с тем, что лептоспиры обладают высокой инвазивностью: характерной штопорообразной формой и подвижностью, что позволяет им эффективно преодолевать различные барьеры, такие как соединительная ткань, а также способностью вырабатывать протеазы и гемолизины для более легкого проникновения сквозь ткани [13, 30, 38]. Инфекционный процесс начинается с попадания патогенных лептоспир в кровотоки, где они прикрепляются к эндотелию сосудов, а затем при генерализации процесса адгезируют к открытым компонентам внеклеточных структур в тканях [17, 30]. ЛПС, которые содержатся в клеточной стенке лептоспир, оказывают воздействие на нейтрофилы и тромбоциты, что способствует их адгезии. Сфингомиелинфосфодиэстераза и гемолизины, продуцируемые лептоспирами, ослабляя эндотелиальные клеточные барьеры, вызывают острый васкулит, который влечет за собой геморрагический синдром с нарушением микроциркуляции. В дальнейшем возникают отеки и кровоизлияния как под кожей, так и в органах-мишенях [17, 39, 40].

⁶ Ветеринарные правила осуществления профилактических, диагностических, лечебных, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов лептоспироза: утв. приказом Минсельхоза России от 10.11.2023 № 847. <https://docs.cntd.ru/document/1304283686>

⁷ Лептоспирозы людей и животных. Под ред. проф. В. В. Ананьина. М.: Медицина; 1971. 352 с.

⁸ Малахов Ю. А. Лептоспироз животных. М.: Агропромиздат; 1992. 238 с.

Патогенные лептоспиры обнаруживаются в крови уже через 10 мин у лабораторных животных, которые были экспериментально заражены внутрибрюшинным, внутрикожным и интраорбитальным способом. Гематогенно лептоспиры за короткое время достигают печени, легких и почек. И уже через час после экспериментального заражения патогенные лептоспиры можно выделить из крови, мозга и других органов [17, 40].

В некоторых случаях лептоспироз протекает бессимптомно. У собак течение болезни может быть подострым, острым и хроническим [17, 24]. Клинические признаки зачастую неспецифичны, включают поражения пищеварительного и мочевыделительного тракта. Однако, являясь мультисистемной болезнью, лептоспироз поражает многие другие органы [17, 24, 41].

Лептоспиры могут локализоваться в половых путях, в частности в яйцеводах и матке, способны проникать через гематоплацентарный барьер, а также прикрепляться к блестящей оболочке млекопитающих животных, в том числе человека. Есть опубликованные данные, что лептоспиры поражают молочную железу и дренирующие ее лимфатические узлы, а также что они могут локализоваться внутри глазного яблока животных, вызывая увеит и слепоту [17, 24].

Достигаая органов-мишеней, а именно почек, патогенные лептоспиры провоцируют многофакторное поражение, которое выражается интерстициальным нефритом. Иницируется некроз эндотелиальных клеток и основной мембраны клубочков. В последующем в процесс вовлекаются почечные извитые канальца. Спровоцированный инфекционный процесс впоследствии влечет за собой развитие острой почечной недостаточности с анурией [25]. При появлении клинической картины желтухи или почечной недостаточности необходима дифференциальная диагностика [41].

Персистенция лептоспир в органах-мишенях приводит к активации затяжного воспалительного процесса, инфильтрации пораженного органа и в конечном счете – к отложению коллагена и фибронектина в интерстиции. Несмотря на то что данные процессы изучены недостаточно, высказаны предположения, что они обуславливают хроническое течение лептоспироза [42]. Хронический лептоспироз описывается реже, его часто труднее диагностировать, поскольку признаки могут наблюдаться у вакцинированных животных [17].

ПАТОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ

Признаками лептоспироза являются острый интерстициальный нефрит и гемолитическая желтуха. При гистологическом исследовании отмечаются поражения и легочной ткани, которые характеризуются различной степенью внутриальвеолярных кровоизлияний при отсутствии или небольшом количестве экссудата. При патолого-анатомическом исследовании выявляют энтерит, панкреатит, миокардит, фиброз и другие изменения паренхиматозных органов в зависимости от течения болезни и тяжести патогенеза [17, 43].

При проведении гистологических исследований почек собак, инфицированных лептоспирами, были обнаружены изменения, которые характерны для интерстициального нефрита, атрофии почечных клубочков, зернистой дистрофии и десквамации эпителия, а также избыточное отложение гемосидерина в тканях, что вызвано усиленным распадом эритроцитов. На препаратах визуализировалось увеличение

количества и диаметра почечных клубочков, извитых и прямых мочевых канальцев. Наблюдались и другие изменения: тромбы в капиллярах миокарда, геморрагический гломерулонефрит, ателектаз, выраженное полнокровие легочных вен и капилляров междольковых перегородок, вакуольная и пигментная дистрофия печени [17, 44].

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЛЕПТОСПИРОЗА

Возбудитель лептоспироза можно выделить из таких клинических материалов, как кровь, моча, молоко, спинномозговая жидкость, и из патологического материала. Из спинномозговой жидкости – в первую неделю, из мочи – на второй неделе после начала заболевания [36].

Диагностика лептоспироза заключается в проведении серологических реакций, направленных на детекцию и идентификацию лептоспир, таких как реакция микроагглютинации (РМА) и иммуноферментный анализ (ИФА), рекомендованных Всемирной организацией здравоохранения животных [24, 31, 45, 46]. Постановка РМА является эталонным (референтным) методом диагностики лептоспироза [31]. При этом РМА больше подходит для подтверждения отсутствия инфекции перед перемещением животных, а также для подтверждения клинических случаев. Однако для последней цели наиболее эффективен ИФА, кроме того, он позволяет оценивать иммунный статус у животных после вакцинации, чем не обладает РМА [46]. Положительные результаты РМА всегда интерпретируются как заболевание или лептоспиросительство, без учета давности вакцинации⁹. Поэтому для точности диагноза при низких титрах антител целесообразно подтверждать результаты методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) или выделением возбудителя бактериологическим методом. Из-за своей морфологии и быстрого передвижения лептоспиры не визуализируются в световом микроскопе, поэтому их наличие детектируют при помощи темнопольного микроскопа [21]. Также для обнаружения лептоспир используют метод импрегнации серебром по Фонтана – Трибондо или Левадити. При таком способе спирохеты *Leptospira* окрашиваются в черно-коричневый цвет и визуализируются на светлом фоне. Минимальный уровень обнаружения лептоспир составляет 10⁴ на миллилитр крови [47]. Хотя лептоспиры формально относятся к грамотрицательным бактериям, они слабо окрашиваются анилиновыми красителями, что делает их похожими на грамположительные микроорганизмы при микроскопическом исследовании. Кристаллический фиолетовый может применяться для окрашивания биопленки, образованной лептоспирами, для дальнейшего измерения оптической плотности с помощью спектрофотометра [48].

Подбор подходящих диагностических подходов зависит от стадии течения заболевания. В острой фазе диагностировать лептоспироз можно с помощью бактериологического метода (культивирования на селективных питательных средах) или ПЦР [36]. ПЦР позволяет дифференцировать лептоспиры по сероварам [45].

⁹ ГОСТ 25386-91 Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики лептоспироза. <https://docs.cntd.ru/document/1200025477>

Для амплификации ДНК спирохет *Leptospira* предпочтительна постановка ПЦР с образцами цельной крови, в которой присутствует этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) в качестве антикоагулянта, так как гепарин угнетает реакцию ПЦР. Нижнее пороговое значение составляет 100 лептоспир в 1 мл крови или мочи. Патогенные спирохеты *Leptospira* можно отличить от сапрофитных с помощью праймеров, которые выявляют гены, такие как *lipL32*, *ligA*, *ligB*, имеющиеся только у патогенных лептоспир [28].

В молекулярной диагностике лептоспироза предпочтение отдают LAMP – петлевой изотермической амплификации. Этот метод обладает экспрессностью, так как в результате амплификации накапливается 10^9 копий целевого фрагмента, а инкубация длится в течение часа на водяной бане при температуре 60–65 °C. В дальнейшем полученную амплифицированную ДНК визуализируют, используя гель-электрофорез. Метод LAMP был разработан также с целью выявления гена *rrs* субъединицы 16S рибосомальной РНК, что позволяет дифференцировать патогенные и сапрофитные спирохеты [28].

По мере выработки антител на второй неделе лептоспиры выводятся из кровотока и начинают выделяться вместе с мочой. Во время этой стадии снижается чувствительность обнаружения ДНК в крови и повышается в моче, также возрастает чувствительность обнаружения антител [36]. С этим хорошо справляется ИФА, который выявляет антитела различных классов, что помогает быстрому купированию инфекционного процесса [45].

При выделении лептоспир их рост происходит медленно, генерация может составлять до 20 ч. Посев крови на питательную среду проводят на 2–4-е сутки и культивируют при температуре 28–30 °C [36].

Существуют экспресс-тесты, которые основаны на выявлении антител в образцах сыворотки крови. Так как антитела образуются не сразу, такие экспресс-тесты не способны выявить лептоспиры в течение 7–10 дней после манифестации. Экспресс-тесты ИХА (иммунохроматографический анализ, тест-полоски с антигеном лептоспир) используют для быстрой постановки дифференциального диагноза [28].

Для селективного выделения лептоспир из образцов окружающей среды можно использовать комбинацию противомикробных препаратов, в состав которой входят: сульфаметоксазол, триметоприм, амфотерицин В, фосфомицин, 5-фторурацил. Данная комбинация при дозировании в питательную среду подавляет рост 16 микроорганизмов, при этом не подавляет рост лептоспир [49].

ЛЕЧЕНИЕ И ПРОФИЛАКТИКА ЛЕПТОСПИРОЗА

При заражении патогенными лептоспирами в первую очередь появляется гуморальный иммунный ответ. Защитные антитела, вырабатываемые во время инфекции, направлены в основном на ЛПС определенных лептоспир, но не обеспечивают перекрестную защиту против ЛПС других сероваров [17, 31].

Как только у хозяина формируется приобретенный иммунный ответ, бактериемия снижается, однако лептоспиры могут локализоваться в виде биопленки внутри глазного яблока [17, 50].

В большинстве случаев у собак не происходит полного выздоровления после переболевания лептоспирозом, животные становятся бессимптомными

носителями лептоспир, поскольку спирохеты долго персистируют в извитых почечных канальцах, где не синтезируются секреторные IgA. Образующий иммунитет нестерилен, вследствие чего животное является источником возбудителя инфекции для человека и других животных [2, 43].

Согласно действующим нормативно-правовым актам¹⁰, профилактика и борьба с лептоспирозом включают: диагностические мероприятия, ограничительные меры, ликвидацию очагов инфекции, вакцинацию восприимчивых животных.

Лечение лептоспироза у собак охватывает все звенья существующей терапии. Этиологическая терапия заключается в применении антибиотиков, относящихся к цефалоспорином, пенициллинам, тетрациклинам (в частности, доксициклин), при этом макролиды (азитромицин) могут быть подходящей альтернативой в случае выделения антибиотикорезистентных штаммов лептоспир. Стоит также отметить, что *Leptospira* spp. устойчивы к хлорамфениколу, метронидазолу, рифампицину или ванкомицину [17, 51, 52]. Несмотря на высокую эффективность антибиотикотерапии при лептоспирозе, в некоторых случаях у пациентов может наблюдаться реакция Яриша – Герксгеймера в связи с высвобождением эндотоксинов при гибели лептоспир [52]. Поддерживающая терапия направлена на восстановление и функциональную реабилитацию пораженных органов. В тяжелых случаях необходима заместительная терапия: диализ, восполнение дефицита факторов свертывания крови и дотация электролитов [17].

Первая иммунизация инактивированными фенолом лептоспирами, сформировавшая защитный иммунитет у морских свинок, была успешно проведена в 1914 г. в Японии. В то же время было установлено, что возможно проведение пассивной иммунизации больных животных с помощью гипериммунной сыворотки. За последние 100 лет было проведено множество экспериментальных исследований по инаktivации лептоспир, для этого использовали фенол, этанол, формалин, а также различные методы: нагревание, замораживание – оттаивание, ультрафиолетовое бактерицидное облучение [53].

В настоящее время разработан ряд вакцин для профилактики лептоспироза у собак. Иммунизация защищает животное от острого течения болезни, но не может предотвратить инфицирование, если собака подвергается воздействию высокоинвазивного штамма. Защита опосредована антителами, выработанными при Т-независимом иммунном ответе на ЛПС лептоспир, при котором сразу реагируют В-лимфоциты и начинают продуцироваться иммуноглобулин класса М. При этом вакцины не способны полностью защитить организм от заражения другими серогруппами из-за отсутствия перекрестной защиты, поэтому информация о серогруппах лептоспир, которые циркулируют в определенном географическом регионе, остается важным фактором для разработки вакцины [17, 41, 54].

Существуют вакцины, в состав которых входит серогруппа Australis, однако для нашей страны лептоспиры

¹⁰ Ветеринарные правила осуществления профилактических, диагностических, лечебных, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов лептоспироза: утв. приказом Минсельхоза России от 10.11.2023 № 847. <https://docs.cntd.ru/document/1304283686>

данной серогруппы являются менее актуальными. Также применяются инактивированные поливалентные вакцины, созданные на основе производственных штаммов серогрупп *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Romona* и *Grippotyphosa* с адъювантом¹¹ [18, 55].

На основании актуальных рекомендаций Всемирной ветеринарной ассоциации мелких домашних животных (WSAVA) и опубликованных данных первая вакцинация щенков против лептоспироза проводится в возрасте 6–8 нед. с последующей ревакцинацией через 2–4 нед. Формирование иммунного ответа у щенков имеет свои особенности: пассивный иммунитет, полученный от матери, начинает снижаться к 8–12-недельному возрасту, при этом у отдельных особей формирование активного иммунитета может происходить раньше из-за низкого уровня материнских антител [56].

В возрасте 12 мес. проводится ревакцинация, после которой иммунизация осуществляется ежегодно, при этом схема может корректироваться с учетом региональных особенностей, эпизоотической ситуации и условий содержания животного. В регионах, стационарно неблагополучных по лептоспирозу, рекомендовано вводить третью дозу вакцины через 3 мес. после второй дозы, что создает напряженный иммунитет продолжительностью не менее 1 года [56, 57].

При создании субъединичных вакцин используют компоненты внешней мембраны, такие как ЛПС, поверхностные белки, гликопротеины и анатоксины, благодаря чему они являются передовым поколением препаратов [23]. Наиболее перспективным в разработке эффективного препарата для иммунизации животных с обеспечением перекрестной защиты может стать белок A (LigA) наружной мембраны лептоспир, который имеет 12–13 иммуноглобулиноподобных повторяющихся доменов, но для этого нужны дальнейшие исследования [23].

На данный момент ведется производство вакцин против лептоспироза собак на основе инактивированного цельного бактериона, а также разработка экспериментальных образцов вакцин, содержащих рекомбинантные белки. Все коммерческие лицензированные вакцины, представленные на данный момент и используемые в ветеринарии против лептоспироза животных, основаны на инактивированных цельных лептоспирах. При введении животным такого рода антигена индуцируется выработка антител организма к ЛПС лептоспир. Гуморальный иммунный ответ, выработанный у животных после проведенной вакцинации, так же как и иммунный ответ у переболевших животных, является специфичным лишь для входящих в состав вакцины серовариантов лептоспир. Такие вакцины не способны стимулировать выработку перекрестного иммунитета у животных и требуют ежегодных повторных иммунизаций [58].

ДНК-вакцины имеют свойство напрямую трансфицировать клетки животных путем введения плазмид, кодирующих эпитопы антигенов. Иммунизация животных с помощью ДНК-вакцин может спровоцировать повышенную экспрессию гетерологичного антигена и выработку клеточного и гуморального иммунного ответа [27].

Что касается вакцин, содержащих живые лептоспиры, существует работа, описывающая иммунизацию хомяков и свиней живой вакциной против лептоспироза. Доказано, что аттенуированный в лабораторных условиях серовар *Romona* вызывал защитный иммунитет, который сохранялся 14 мес. Однако дальнейшего развития экспериментальная вакцина не получила, и на данный момент не существует зарегистрированных живых вакцин против возбудителя лептоспироза [53].

Таким образом, проблема лептоспироза продолжает сохранять высокую актуальность для Российской Федерации, а система диагностики и регистрации случаев среди животных, особенно это касается собак, остается несовершенной. У собак заболевание маскируется под иные патологии, что ведет к пропуску заболевших и неполному учету. Между тем именно достоверные данные о выявленных случаях позволяют определить циркулирующие на территории серогруппы и штаммы *Leptospira*, без чего невозможно создать вакцины с оптимальной антигенной формулой и надежной перекрестной защитой. Неполная регистрация формирует «слепые зоны» в эпизоотологическом надзоре, затрудняет прогнозирование вспышек и повышает риски зоонозной передачи. Для решения проблемы необходимо усилить ветеринарный надзор, внедрить улучшенные алгоритмы диагностики (при положительном результате РМА проводить ПЦР на наличие ДНК возбудителя) и наладить оперативную передачу данных в региональные и федеральные реестры – это позволит актуализировать карту распространения возбудителя лептоспироза, повысить эффективность вакцинопрофилактики и снизить риски заражения людей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лептоспироз представляет собой зоонозное инфекционное заболевание, вызываемое бактериями рода *Leptospira*. Особую эпидемиологическую значимость представляет трансмиссия возбудителя от собак к человеку через различные биотические и абиотические факторы передачи. Низкая эффективность существующих вакцинных препаратов в формировании иммунного ответа против циркулирующих серогрупп патогена актуализирует необходимость создания усовершенствованной вакцины. Такой препарат должен обеспечивать поливалентную защиту от эндемичных для Российской Федерации штаммов и способствовать формированию надежного барьера против широкого спектра патогенных вариантов возбудителя. Разработка подобной вакцины станет значимым вкладом в контроль распространения данной инфекции среди людей и животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Adler B., de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*. 2010; 140 (3–4): 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>
- Алферина Е. Н., Маркосьян Н. С., Обьедкина Я. А., Корнев Н. С. Эпидемиологическая ситуация по лептоспирозу в мире и в Российской Федерации. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2024; (11). <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.149.40>
- Philip N., Ahmed K. Leptospirosis in Malaysia: current status, insights, and future prospects. *Journal of Physiological Anthropology*. 2023; 42:30. <https://doi.org/10.1186/s40101-023-00347-y>
- Costa F., Hagan J. E., Calcagno J., Kane M., Torgerson P., Martinez-Silveira M. S., et al. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2015; 9 (9):e0003898. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>
- Hampson K., Coudeville L., Lembo T., Sambo M., Kieffer A., Attlan M., et al. Estimating the global burden of endemic canine rabies. *PLoS*

¹¹ Франц Д., Ньюби Т. Д., Такер К. М. Поливалентные вакцины для собак против *Leptospira bratislava* и других патогенов. Патент № 2400248 С2 Российская Федерация, МПК А61К 39/295, А61Р 31/04, А61Р 31/12. Пфайзер Продактс Инк. № 2007112480/13. Заявл. 23.09.2005. Оpubл. 27.09.2010. Бюл. № 27.

- Neglected Tropical Diseases*. 2015; 9 (4):e0003709. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003709>. Erratum in: *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2015; 9 (5):e0003786. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003786>
6. Агасиев А. Ш., Сулейманов Ф. И., Шутенков А. Г. Лептоспироз животных на юге Псковской области и меры по его профилактике. *Известия Великолукской государственной сельскохозяйственной академии*. 2017; (3): 2–8. <https://elibrary.ru/zitdrh>
 7. Болоцкий И. А., Семенцов В. И., Резникова М. Ф. Этиологическая структура лептоспироза животных на Северном Кавказе. *Ветеринария*. 1999; (11): 17–19.
 8. Ido Y., Hoki R., Ito H., Wani H. The prophylaxis of weill's disease (*Spirochaetosis icterohaemorrhagica*). *Journal of Experimental Medicine*. 1916; 24 (5): 471–483. <https://doi.org/10.1084/jem.24.5.471>
 9. André-Fontaine G. Canine leptospirosis – do we have a problem? *Veterinary Microbiology*. 2006; 117 (1): 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.04.005>
 10. Бренева Н. В., Балахонов С. В., Алленов А. В., Борзов В. П., Громова Т. В., Демьянова Н. А., Медведева Н. В. Клинико-эпидемиологические особенности лептоспироза в Сибири и на Дальнем Востоке. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2018; 7 (3): 62–67. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2018-13009>
 11. Yadav P., Pal S., Goud P. M. K., Khandelwal S., Naveen D. Leptospirosis: Investigating Swine as a Reservoir for Human Infections. In: *Emerging Zoonotic Threats from Swine*. Ed. by R. Deb, J. Nayak, G. S. Sengar, V. K. Gupta. Singapore: Springer; 2025; 265–287. https://doi.org/10.1007/978-981-96-7407-7_15
 12. Соболева Г. Л., Ананьина Ю. В., Непоклонова И. В. Актуальные вопросы лептоспироза людей и животных. *Российский ветеринарный журнал*. 2017; (8): 14–18. <https://elibrary.ru/zignit>
 13. Зиновьева О. Е., Зюзина С. В., Иванченко А. Ю., Сковорода А. Н., Лобова Т. П. Этиологическая структура лептоспироза собак: обзор научной литературы. *Ветеринарная патология*. 2025; 24 (1): 23–30. <https://doi.org/10.23947/2949-4826-2025-24-1-23-30>
 14. Соболева Г. Л., Непоклонова И. В. Лептоспироз кошек: заблуждения и реальность. *Российский ветеринарный журнал*. 2021; (3): 5–13. <https://doi.org/10.32416/2500-4379-2021-3-5-13>
 15. Харченко Г. А., Кимирилова О. Г. Иктерогеморрагический лептоспироз у ребенка грудного возраста: клинический случай. *Вопросы современной педиатрии*. 2021; 20 (2): 166–170. <https://doi.org/10.15690/vsp.v20i2.2261>
 16. Остякова М. Е., Емельянов О. Н. Лептоспироз природных и антропоургических очагов Хабаровского края. *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии*. 2023; (4): 97–102. <http://lib.ugsha.ru:8080/handle/123456789/32252>
 17. Sykes J. E., Francey T., Schuller S., Stoddard R. A., Cowgill L. D., Moore G. E. Updated ACVIM consensus statement on leptospirosis in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2023; 37 (6): 1966–1982. <https://doi.org/10.1111/jvim.16903>
 18. Троценко А. А., Коврижко М. В., Яговкин Э. А., Ванжа В. С., Решетов А. А. Изучение биологических свойств штаммов *Leptospira interrogans* серогруппы *Canicola* в качестве кандидатов для включения в состав вакцины лептоспирозной концентрированной инактивированной жидкой для людей. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021; (1): 64–69. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-1-64-69>
 19. Норбутаев Н. Т., Муминов А. А. Роль грызунов в сохранении природных очагов лептоспироза. *Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана*. 2014; 220 (4): 180–183. <https://elibrary.ru/tdrmlh>
 20. Coburn J., Picardeau M., Woods C. W., Veldman T., Haake D. A. Pathogenesis insights from an ancient and ubiquitous spirochete. *PLoS Pathogens*. 2021; 17 (10):e1009836. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009836>
 21. Cameron C. E. Leptospiral Structure, Physiology, and Metabolism. In: *Leptospira and Leptospirosis*. Ed. by B. Adler. Berlin, Heidelberg: Springer; 2015; 21–41. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_3
 22. Ваганова А. Н. Наружная мембрана патогенных представителей рода *Leptospira*. *Инфекция и иммунитет*. 2011; 1 (1): 29–42. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2011-1-29-42>
 23. Varma V. P., Kadivella M., Kavela S., Faisal S. M. *Leptospira* lipid A is a potent adjuvant that induces sterilizing immunity against leptospirosis. *Vaccines*. 2023; 11 (12):1824. <https://doi.org/10.3390/vaccines11121824>
 24. Samrot A. V., Sean T. C., Bhavya K. S., Sahithya C. S., Chandrasekaran S., Palanisamy R., et al. Leptospiral infection, pathogenesis and its diagnosis – a review. *Pathogens*. 2021; 10 (2):145. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020145>
 25. Fraga T. R., Barbosa A. S., Isaac L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2011; 73 (5): 408–419. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2010.02505.x>
 26. Инфекционные болезни: национальное руководство. Под ред. Н. Д. Ющука, Ю. Я. Венгеровой. 3-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2021. 1104 с.
 27. Richard E., Bourhy P., Picardeau M., Moulin L., Wurtzer S. Effect of disinfection agents and quantification of potentially viable *Leptospira* in fresh water samples using a highly sensitive integrity-qPCR assay. *PLoS ONE*. 2021; 16 (5):e0251901. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251901>
 28. Grassmann A. A., da Cunha C. E. P., Bettin E. B., McBride A. J. A. Overview of Leptospirosis. In: *Neglected Tropical Diseases – South Asia*. Ed. by S. K. Singh. Cham: Springer; 2017; 245–275. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68493-2_8
 29. Киселева Е. Ю., Бренева Н. В., Носков А. К., Шаракшанов М. Б., Балахонов С. В., Gefan H. Г. Методы лабораторной диагностики лептоспирозов: особенности постановки, преимущества и недостатки. *Acta Biomedica Scientifica*. 2015; (3): 85–93. <https://www.actabiomedica.ru/jour/article/view/77>
 30. Picardeau M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nature Reviews Microbiology*. 2017; 15 (5): 297–307. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5>
 31. Sykes J. E., Reagan K. L., Nally J. E., Galloway R. L., Haake D. A. Role of diagnostics in epidemiology, management, surveillance, and control of leptospirosis. *Pathogens*. 2022; 11 (4):395. <https://doi.org/10.3390/pathogens11040395>
 32. Vincent A. T., Schiettekatte O., Goarant C., Neela V. K., Bernet E., Thibeaux R., et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2019; 13 (5):e0007270. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270>
 33. Гнатенко А. В., Коваленко В. Л., Куликова В. В., Уховский В. В. Устойчивость тест-культуры лептоспир к бактерицидному препарату «Аргидид». *Вестник Алтайского государственного аграрного университета*. 2013; (10): 99–102. <https://elibrary.ru/rdkeup>
 34. Полищук С. В., Быченко Д. Д. Влияние вторичных движущих сил эпизоотического процесса на биологический резервуар лептоспироза в Республике Крым. *Известия сельскохозяйственной науки Тавриды*. 2023; (33): 125–136. <https://elibrary.ru/nolvbh>
 35. Warnasekara J., Agampodi S., Abeynayake R. R. Time series models for prediction of leptospirosis in different climate zones in Sri Lanka. *PLoS ONE*. 2021; 16 (5):e0248032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248032>
 36. Koizumi N. Laboratory Diagnosis of Leptospirosis. In: *Leptospira spp. Methods and Protocols*. Ed. by N. Koizumi, M. Picardeau. New York: Humana; 2020; 2134: 277–287. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0459-5_25
 37. Beauté J., Innocenti F., Aristodimou A., Špačková M., Eves C., Kerbo N., et al. Epidemiology of reported cases of leptospirosis in the EU/EEA, 2010 to 2021. *Euro Surveillance*. 2024; 29 (7):2300266. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2024.29.7.2300266>
 38. Abe K., Kuribayashi T., Takabe K., Nakamura S. Implications of back-and-forth motion and powerful propulsion for spirochetal invasion. *Scientific Reports*. 2020; 10 (1):13937. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70897-z>
 39. Daroz B. B., Fernandes L. G. V., Cavenague M. F., Kochi L. T., Passalia F. J., Takahashi M. B., et al. A review on host-*Leptospira* interactions: what we know and future expectations. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021; 11:777709. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.777709>
 40. Nicodemo A. C., Duarte-Neto A. N. Pathogenesis of pulmonary hemorrhagic syndrome in human leptospirosis. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2021; 104 (6): 1970–1972. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-1000>
 41. Rahman S. A., Khor K. H., Khairani-Bejo S., Lau S. F., Mazlan M., Roslan A., Goh S. H. Detection and characterization of *Leptospira* spp. in dogs diagnosed with kidney and/or liver disease in Selangor, Malaysia. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2021; 33 (5): 834–843. <https://doi.org/10.1177/10406387211024575>
 42. Prado L. G., Barbosa A. S. Understanding the renal fibrotic process in leptospirosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22 (19):10779. <https://doi.org/10.3390/ijms221910779>. Correction: *Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23 (16):9233. <https://doi.org/10.3390/ijms23169233>
 43. Haake D. A., Levett P. N. Leptospirosis in Humans. In: *Leptospira and Leptospirosis*. Ed. by B. Adler. Berlin, Heidelberg: Springer; 2015; 65–97. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_5
 44. Xu Y., Zheng H., Zhang Y., Wang Y., Zhang J., Li Z., et al. Genomic analysis of a new serovar of *Leptospira weilii* serogroup Manhao. *Frontiers in Microbiology*. 2017; 8:149. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00149>
 45. Andrade-Silveira E., Ortega-Pacheco A., Jiménez-Coello M., Cárdenas-Marrufo M. Review of leptospirosis in dogs from Mexico: epidemiology, diagnosis, prevention, and treatment. *Veterinary World*. 2024; 17 (6): 1356–1361. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2024.1356-1361>
 46. WOA. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals>
 47. Мазуркова Т. О. Основы диагностики лептоспироза животных. *Вестник магистратуры*. 2018; (8): 12–14. <https://elibrary.ru/fuxqul>
 48. Thibeaux R., Kainiu M., Goarant C. Biofilm Formation and Quantification Using the 96-Microtiter Plate. In: *Leptospira spp. Methods and Protocols*. Ed. by N. Koizumi, M. Picardeau. New York: Humana; 2020; 2134: 207–214. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0459-5_19
 49. Chakraborty A., Miyahara S., Villanueva S. Y. A. M., Saito M., Gloriani N. G., Yoshida S. A novel combination of selective agents for isolation of *Leptospira* species. *Microbiology and Immunology*. 2011; 55 (7): 494–501. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00347.x>
 50. Wollanke B., Gerhards H., Ackermann K. Infectious uveitis in horses and new insights in its leptospiral biofilm-related pathogenesis. *Microorganisms*. 2022; 10 (2):387. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020387>
 51. Ji Z., Jian M., Su X., Pan Y., Duan Y., Ma W., et al. Efficacy and safety of antibiotics for treatment of leptospirosis: a systematic review and network meta-analysis. *Systematic Reviews*. 2024; 13 (1):108. <https://doi.org/10.1186/s13643-024-02519-y>

52. Petakh P., Behzadi P., Oksenykh V., Kamysnykh O. Current treatment options for leptospirosis: a mini-review. *Frontiers in Microbiology*. 2024; 15:1403765. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1403765>
 53. Adler B. Vaccines Against Leptospirosis. In: *Leptospira and Leptospirosis*. Ed. by B. Adler. Berlin, Heidelberg: Springer; 2015; 251–272. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_10
 54. Bergmann Esteves S., Moreira Santos C., Ferreira Salgado F., Paldés Gonçalves A., Gil Alves Guilloux A., Marinelli Martins C., et al. Efficacy of commercially available vaccines against canine leptospirosis: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine*. 2022; 40 (12): 1722–1740. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.02.021>
 55. Зиновьева О. Е., Зюзгина С. В., Бабицева О. В., Балаева А. Р., Марзанова С. Н. Этиологическая характеристика и анализ рынка вакцин против лептоспироза животных. *Ветеринария, зоотехния и биотехнология*. 2021; (8): 40–50. <https://doi.org/10.36871/vet.zoo.bio.202108005>
 56. Сквайрс Р. А., Кроуфорд С., Маркондес М., Уитли Н. Руководство по вакцинации собак и кошек 2024 г., составленное Группой по составлению руководств по вакцинации (VGG) Всемирной ассоциации ветеринарии мелких домашних животных (WSAVA). https://wsava.org/wp-content/uploads/2024/12/WSAVA-Vaccination-guidelines-2024_rus-compressed.pdf
 57. Dodds W. J. Early life vaccination of companion animal pets. *Vaccines*. 2021; 9 (2):92. <https://doi.org/10.3390/vaccines9020092>
 58. Prapong S., Tansiri Y., Sritrakul T., Sripattanakul S., Sopitthummakun A., Katzenmeier G., et al. *Leptospira borgpetersenii* leucine-rich repeat proteins provide strong protective efficacy as novel leptospiral vaccine candidates. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. 2022; 8 (1):6. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8010006>
- ## REFERENCES
1. Adler B., de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*. 2010; 140 (3–4): 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>
 2. Alferina E. N., Markosyan N. S., Obedkina Y. A., Kornev N. S. Epidemiological situation of leptospirosis in the world and in the Russian Federation. *International Research Journal*. 2024; (11). <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.149.40> (in Russ.)
 3. Philip N., Ahmed K. Leptospirosis in Malaysia: current status, insights, and future prospects. *Journal of Physiological Anthropology*. 2023; 42:30. <https://doi.org/10.1186/s40101-023-00347-y>
 4. Costa F., Hagan J. E., Calcagno J., Kane M., Torgerson P., Martinez-Silveira M. S., et al. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2015; 9 (9):e0003898. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>
 5. Hampson K., Coudeville L., Lembo T., Sambo M., Kieffer A., Attlan M., et al. Estimating the global burden of endemic canine rabies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2015; 9 (4):e0003709. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003709>. Erratum in: *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2015; 9 (5):e0003786. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003786>
 6. Agasiev A. Sh., Suleymanov F. I., Shutenkov A. G. Leptospiroz zhivotnykh na yuge Pskovskoi oblasti i mery po ego profilaktike = Leptospirosis in animals within the southern districts of Pskov Oblast and prevention strategies. *Proceedings of the State Agricultural Academy of Velikie Luki*. 2017; (3): 2–8. <https://elibrary.ru/zitdrh> (in Russ.)
 7. Bolotsky I. A., Sementsov V. I., Reznikova M. F. Etiologicheskaya struktura leptospiroza zhivotnykh na Severnom Kavkaze = Etiological structure of leptospirosis in animals in the North Caucasus. *Veterinariya*. 1999; (11): 17–19. (in Russ.)
 8. Ido Y., Hoki R., Ito H., Wani H. The prophylaxis of weill's disease (*Spirochaetosis icterohaemorrhagica*). *Journal of Experimental Medicine*. 1916; 24 (5): 471–483. <https://doi.org/10.1084/jem.24.5.471>
 9. André-Fontaine G. Canine leptospirosis – do we have a problem? *Veterinary Microbiology*. 2006; 117 (1): 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.04.005>
 10. Breneva N. V., Balakhonov S. V., Allenov A. V., Borzov V. P., Gromova T. V., Demyanova N. A., Medvedeva N. V. Clinical and epidemiological features of leptospirosis in Siberia and the Far East. *Infectious Diseases: News, Opinions, Training*. 2018; 7 (3): 62–67. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2018-13009> (in Russ.)
 11. Yadav P., Pal S., Goud P. M. K., Khandelwal S., Naveen D. Leptospirosis: Investigating Swine as a Reservoir for Human Infections. In: *Emerging Zoonotic Threats from Swine*. Ed. by R. Deb, J. Nayak, G. S. Sengar, V. K. Gupta. Singapore: Springer; 2025; 265–287. https://doi.org/10.1007/978-981-96-7407-7_15
 12. Soboleva G. L., Ananyina Y. V., Nepoklonova I. V. Actual problems of human and animal leptospirosis. *Russian Veterinary Journal*. 2017; (8): 14–18. <https://elibrary.ru/zignit> (in Russ.)
 13. Zinovieva O. E., Zyzgina S. V., Ivanchenko A. Yu., Skvortsova A. N., Lobova T. P. Etiological structure of canine leptospirosis: a literature review. *Russian Journal of Veterinary Pathology*. 2025; 24 (1): 23–30. <https://doi.org/10.23947/2949-4826-2025-24-1-23-30> (in Russ.)
 14. Soboleva G. L., Nepoklonova I. V. Leptospirosis in cats: misconceptions and reality. *Russian Veterinary Journal*. 2021; (3): 5–13. <https://doi.org/10.32416/2500-4379-2021-3-5-13> (in Russ.)
 15. Kharchenko G. A., Kimirilova O. G. Icterohemorrhagic leptospirosis in infant: clinical case. *Current Pediatrics*. 2021; 20 (2): 166–170. <https://doi.org/10.15690/vsp.v20i2.2261> (in Russ.)
 16. Ostyakova M. E., Emelyanov O. N. Leptospirosis of natural and anthropogenic foci of the Khabarovsk territory. *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy*. 2023; (4): 97–102. <http://lib.ugsha.ru:8080/handle/123456789/32252> (in Russ.)
 17. Sykes J. E., Francey T., Schuller S., Stoddard R. A., Cowgill L. D., Moore G. E. Updated ACVIM consensus statement on leptospirosis in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2023; 37 (6): 1966–1982. <https://doi.org/10.1111/jvim.16903>
 18. Trotsenko A. A., Kovrizhko M. V., Yagovkin E. A., Vanzha V. S., Reshetov A. A. Study of biological properties of *Leptospira interrogans* serovar *Canicola* strains as candidate components of human leptospirosis concentrated inactivated vaccine. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021; 21 (1): 64–69. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-1-64-69> (in Russ.)
 19. Norbutaev N. T., Muminov A. A. The role of rodents to preserve nature of natural emphases of leptospirosis. *Scientific notes Kazan Bauman State Academy of Veterinary Medicine*. 2014; 220 (4): 180–183. <https://elibrary.ru/tdrmlh> (in Russ.)
 20. Coburn J., Picardeau M., Woods C. W., Veldman T., Haake D. A. Pathogenesis insights from an ancient and ubiquitous spirochete. *PLoS Pathogens*. 2021; 17 (10):e1009836. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009836>
 21. Cameron C. E. Leptospiral Structure, Physiology, and Metabolism. In: *Leptospira and Leptospirosis*. Ed. by B. Adler. Berlin, Heidelberg: Springer; 2015; 21–41. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_3
 22. Vaganova A. N. The outer membrane of pathogenic representatives of the *Leptospira* genus. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2011; 1 (1): 29–42. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2011-1-29-42> (in Russ.)
 23. Varma V. P., Kadivella M., Kavela S., Faisal S. M. *Leptospira* lipid A is a potent adjuvant that induces sterilizing immunity against leptospirosis. *Vaccines*. 2023; 11 (12):1824. <https://doi.org/10.3390/vaccines11121824>
 24. Samrot A. V., Sean T. C., Bhavya K. S., Sahithya C. S., Chandrasekaran S., Palanisamy R., et al. Leptospiral infection, pathogenesis and its diagnosis – a review. *Pathogens*. 2021; 10 (2):145. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020145>
 25. Fraga T. R., Barbosa A. S., Isaac L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2011; 73 (5): 408–419. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2010.02505.x>
 26. Infectious Diseases: National Manual. Ed. by N. D. Yuschuk, Yu. Ya. Vengerov. 3rd ed., revised and supplemented. Moscow: GEOTAR-Media; 2021. 1104 p. (in Russ.)
 27. Richard E., Bourhy P., Picardeau M., Moulin L., Wurtzer S. Effect of disinfection agents and quantification of potentially viable *Leptospira* in fresh water samples using a highly sensitive integrity-qPCR assay. *PLoS ONE*. 2021; 16 (5):e0251901. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251901>
 28. Grassmann A. A., da Cunha C. E. P., Bettin E. B., McBride A. J. A. Overview of Leptospirosis. In: *Neglected Tropical Diseases – South Asia*. Ed. by S. K. Singh. Cham: Springer; 2017; 245–275. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68493-2_8
 29. Kiseleva Ye. Yu., Breneva N. V., Noskov A. K., Sharakshanov M. B., Balakhonov S. V., Gefan N. G. Methods for leptospirosis laboratory diagnostics: features of experimentation, advantages and limitations. *Acta Biomedica Scientifica*. 2015; (3): 85–93. <https://www.actabiomedica.ru/jour/article/view/77> (in Russ.)
 30. Picardeau M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nature Reviews Microbiology*. 2017; 15 (5): 297–307. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5>
 31. Sykes J. E., Reagan K. L., Nally J. E., Galloway R. L., Haake D. A. Role of diagnostics in epidemiology, management, surveillance, and control of leptospirosis. *Pathogens*. 2022; 11 (4):395. <https://doi.org/10.3390/pathogens11040395>
 32. Vincent A. T., Schiettekatte O., Goarant C., Neela V. K., Bernet E., Thibaux R., et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2019; 13 (5):e0007270. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270>
 33. Gnatenko A. V., Kovalenko V. L., Kulikova V. V., Ukhovskiy V. V. Determination of *Leptospira* testing cultures' resistance to Argicid bactericidal disinfectant. *Bulletin of Altai State Agricultural University*. 2013; (10): 99–102. <https://elibrary.ru/rdkeup> (in Russ.)
 34. Polishchuk S. V., Bychenko D. D. The influence of secondary driving forces of the epizootic process on the biological reservoir of leptospirosis in the Republic of Crimea. *Transactions of Taurida Agricultural Science*. 2023; (33): 125–136. <https://elibrary.ru/nolvbh> (in Russ.)
 35. Warnasekara J., Agampodi S., Abeynayake R. R. Time series models for prediction of leptospirosis in different climate zones in Sri Lanka. *PLoS ONE*. 2021; 16 (5):e0248032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248032>
 36. Koizumi N. Laboratory Diagnosis of Leptospirosis. In: *Leptospira spp. Methods and Protocols*. Ed. by N. Koizumi, M. Picardeau. New York: Humana; 2020; 2134: 277–287. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0459-5_25
 37. Beauté J., Innocenti F., Aristodimou A., Špačková M., Eves C., Kerbo N., et al. Epidemiology of reported cases of leptospirosis in the EU/EEA, 2010 to 2021. *Euro Surveillance*. 2024; 29 (7):2300266. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2024.29.7.2300266>
 38. Abe K., Kuribayashi T., Takabe K., Nakamura S. Implications of back-and-forth motion and powerful propulsion for spirochetal invasion. *Scientific Reports*. 2020; 10 (1):13937. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70897-z>
 39. Daroz B. B., Fernandes L. G. V., Cavenague M. F., Kochi L. T., Passalia F. J., Takahashi M. B., et al. A review on host-*Leptospira* interactions:

what we know and future expectations. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021; 11:777709. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.777709>

40. Nicodemo A. C., Duarte-Neto A. N. Pathogenesis of pulmonary hemorrhagic syndrome in human leptospirosis. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2021; 104 (6): 1970–1972. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-1000>

41. Rahman S. A., Khor K. H., Khairani-Bejo S., Lau S. F., Mazlan M., Roslan A., Goh S. H. Detection and characterization of *Leptospira* spp. in dogs diagnosed with kidney and/or liver disease in Selangor, Malaysia. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2021; 33 (5): 834–843. <https://doi.org/10.1177/10406387211024575>

42. Prado L. G., Barbosa A. S. Understanding the renal fibrotic process in leptospirosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22 (19):10779. <https://doi.org/10.3390/ijms221910779>. Correction: *Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23 (16):9233. <https://doi.org/10.3390/ijms23169233>

43. Haake D. A., Levett P. N. Leptospirosis in Humans. In: *Leptospira and Leptospirosis*. Ed. by B. Adler. Berlin, Heidelberg: Springer; 2015; 65–97. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_5

44. Xu Y., Zheng H., Zhang Y., Wang Y., Zhang J., Li Z., et al. Genomic analysis of a new serovar of *Leptospira weilii* serogroup Manhao. *Frontiers in Microbiology*. 2017; 8:149. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00149>

45. Andrade-Silveira E., Ortega-Pacheco A., Jiménez-Coello M., Cárdenas-Marrufo M. Review of leptospirosis in dogs from Mexico: epidemiology, diagnosis, prevention, and treatment. *Veterinary World*. 2024; 17 (6): 1356–1361. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2024.1356-1361>

46. WOAH. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals>

47. Mazurkova T. O. Osnovy diagnostiki leptospiroza zhivotnykh = Fundamentals of laboratory diagnosis of leptospirosis in animals. *Vestnik Magistratury*. 2018; (8): 12–14. <https://elibrary.ru/fuxqul> (in Russ.)

48. Thibeaux R., Kainiu M., Goarant C. Biofilm Formation and Quantification Using the 96-Microtiter Plate. In: *Leptospira spp. Methods and Protocols*. Ed. by N. Koizumi, M. Picardeau. New York: Humana; 2020; 2134: 207–214. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0459-5_19

49. Chakraborty A., Miyahara S., Villanueva S. Y. A. M., Saito M., Gloriani N. G., Yoshida S. A novel combination of selective agents for isolation of *Leptospira* species. *Microbiology and Immunology*. 2011; 55 (7): 494–501. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00347.x>

50. Wollanke B., Gerhards H., Ackermann K. Infectious uveitis in horses and new insights in its leptospiral biofilm-related pathogenesis. *Microorganisms*. 2022; 10 (2):387. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020387>

51. Ji Z., Jian M., Su X., Pan Y., Duan Y., Ma W., et al. Efficacy and safety of antibiotics for treatment of leptospirosis: a systematic review and network meta-analysis. *Systematic Reviews*. 2024; 13 (1):108. <https://doi.org/10.1186/s13643-024-02519-y>

52. Petakh P., Behzadi P., Oksenysh V., Kamysnyy O. Current treatment options for leptospirosis: a mini-review. *Frontiers in Microbiology*. 2024; 15:1403765. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1403765>

53. Adler B. Vaccines Against Leptospirosis. In: *Leptospira and Leptospirosis*. Ed. by B. Adler. Berlin, Heidelberg: Springer; 2015; 251–272. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_10

54. Bergmann Esteves S., Moreira Santos C., Ferreira Salgado F., Paldés Gonçalves A., Gil Alves Guilloux A., Marinelli Martins C., et al. Efficacy of commercially available vaccines against canine leptospirosis: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine*. 2022; 40 (12): 1722–1740. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.02.021>

55. Zinovieva O. E., Zyuzgina S. V., Babicheva O. V., Balayeva A. R., Marzanova S. N. Etiological characteristic and analysis of the market of vaccines against animal leptospirosis. *Veterinary, Animal Science and Biotechnology*. 2021; (8): 40–50. <https://doi.org/10.36871/vet.zoo.bio.202108005> (in Russ.)

56. Squires R. A., Crawford C., Marcondes M., Whitley N. 2024 guidelines for the vaccination of dogs and cats – compiled by the Vaccination Guidelines Group (VGG) of the World Small Animal Veterinary Association (WSAVA). <https://wsava.org/wp-content/uploads/2024/04/WSAVA-Vaccination-guidelines-2024.pdf>

57. Dodds W. J. Early life vaccination of companion animal pets. *Vaccines*. 2021; 9 (2):92. <https://doi.org/10.3390/vaccines9020092>

58. Prapong S., Tansiri Y., Sritrakul T., Sripattanakul S., Sopitthummakun A., Katzenmeier G., et al. *Leptospira borgpetersenii* leucine-rich repeat proteins provide strong protective efficacy as novel leptospiral vaccine candidates. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. 2022; 8 (1):6. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8010006>

Поступила в редакцию / Received 17.02.2026

Поступила после рецензирования / Revised 21.04.2026

Принята к публикации / Accepted 18.05.2026

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Быковцева Дарья Андреевна, аспирант, ветеринарный врач лаборатории профилактики болезней мелких домашних животных ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0009-0007-8945-2554>, bykovceva@arriah.ru

Daria A. Bykovtseva, Postgraduate Student, Veterinarian, Laboratory for Pets Diseases Prevention, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0009-0007-8945-2554>, bykovceva@arriah.ru

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

Sergey V. Shcherbinin, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Researcher, Information and Analysis Centre, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-6434-0683>, sherbinin@arriah.ru

Галкина Татьяна Сергеевна, канд. вет. наук, заведующий лабораторией профилактики болезней мелких домашних животных ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-9494-8537>, galkina_ts@arriah.ru

Tatyana S. Galkina, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Head of Laboratory for Pets Diseases Prevention, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-9494-8537>, galkina_ts@arriah.ru

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

Konstantin N. Gruzdev, Dr. Sci. (Biology), Professor, Chief Researcher, Information and Analysis Centre, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-3159-1969>, gruzdev@arriah.ru

Вклад авторов: Быковцева Д. А. – концепция обзора, проведение поисково-аналитической работы, подготовка текста статьи; Щербинин С. В. – проведение поисково-аналитической работы, подготовка текста статьи, редактирование статьи; Галкина Т. С. – научное руководство, редактирование статьи; Груздев К. Н. – научное консультирование, редактирование текста статьи.

Contribution of the authors: Bykovtseva D. A. – review conceptualisation, manuscript drafting, literature search and data analysis; Shcherbinin S. V. – literature search and data analysis, manuscript drafting, manuscript review and editing; Galkina T. S. – research guidance, manuscript revision; Gruzdev K. N. – scientific advising, manuscript review and editing.



<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-252-261>
УДК 619:578.824.11:578.5(571.14)



Филогенетический анализ изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Новосибирской области (Российская Федерация)

С. А. Чупин¹, Е. В. Чернышова¹, А. Д. Ботвинкин², И. Д. Зарва², И. А. Чвала¹, Н. А. Назаров¹, А. Д. Грехнева¹, И. М. Чередникова³, М. А. Тимофеева³

¹ ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), ул. Гвардейская, 6, мкр. Юрьевец, г. Владимир, 600901, Россия

² ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России), ул. Красного Восстания, 1, г. Иркутск, 664003, Россия

³ Новосибирская испытательная лаборатория ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), ул. Серебrenниковская, 5, г. Новосибирск, 630007, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Новосибирская область относится к числу энзоотичных по бешенству субъектов Российской Федерации Сибирского федерального округа, лидируя по числу регистрируемых случаев среди других субъектов округа. В то же время изученность генетических особенностей полевых изолятов вируса бешенства низкая.

Цель исследования. Оценить связи эпизоотий бешенства на энзоотичной территории Новосибирской области с соседними регионами на основе анализа генетического разнообразия вариантов вируса бешенства и их пространственного распределения.

Материалы и методы. Секвенирование двух перекрывающихся фрагментов генома, содержащих полноразмерный ген нуклеопротеина N вируса бешенства, с последующей очисткой и нуклеотидным секвенированием по Сэнгеру осуществляли согласно ранее опубликованному протоколу. При выполнении филогенетического анализа использовали байесовский подход с применением пакета программ Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees (BEAST X).

Результаты. Количество зарегистрированных заболеваний животных бешенством после 2012 г. заметно снизилось и не превышало 60 случаев в год. Все изученные изоляты относятся к генетической группе С. Изоляты классифицируются на два генетических кластера — C2c (35 изолятов) и C2b (18 изолятов). Один из изолятов вируса бешенства выделен в культуре клеток нейробластомы мыши. Представители всех кластеров группы С, выявленных в Новосибирской области, раньше обнаруживались также в Казахстане. Наиболее устойчивые связи прослеживаются с Восточно-Казахстанской (кластеры C2c, C1b) и Северо-Казахстанской (кластеры C2c, C2b) областями. Результаты филогенетического анализа согласуются с ранними описаниями «лисьего» бешенства и с результатами эпизоотологического мониторинга на сопредельных территориях Западной Сибири и Казахстана в современный период.

Заключение. В настоящее время на территории Новосибирской области персистируют варианты вируса бешенства кластеров C2b и C2c, имеющих независимое друг от друга происхождение.

Ключевые слова: вирус бешенства, филогенетический анализ, генетическая группа С, Новосибирская область

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

Для цитирования: Чупин С. А., Чернышова Е. В., Ботвинкин А. Д., Зарва И. Д., Чвала И. А., Назаров Н. А., Грехнева А. Д., Чередникова И. М., Тимофеева М. А. Филогенетический анализ изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Новосибирской области (Российская Федерация). *Ветеринария сегодня*. 2026; 15 (3): 252–261. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-252-261>

Конфликт интересов: Чвала И. А. является членом редколлегии журнала «Ветеринария сегодня», но никакого отношения к решению опубликовать эту статью не имеет. Рукопись прошла принятую в журнале процедуру рецензирования. Об иных конфликтах интересов авторы не заявляли.

Для корреспонденции: Чупин Сергей Александрович, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник референтной лаборатории по бешенству и BSE ФГБУ «ВНИИЗЖ», ул. Гвардейская, 6, мкр. Юрьевец, г. Владимир, 600901, Россия, chupin@arriah.ru

Phylogenetic analysis of rabies virus isolates recovered in the Novosibirsk Oblast (the Russian Federation)

Sergei A. Chupin¹, Elena V. Chernyshova¹, Aleksandr D. Botvinkin², Ivan D. Zarva², Ilya A. Chvala¹, Nikolay A. Nazarov¹, Alena D. Grekhneva¹, Irina M. Cherednikova³, Marina A. Timofeeva³

¹ Federal Centre for Animal Health, ul. Gvardeyskaya, 6, Yur'yevets, Vladimir 600901, Russia

² Irkutsk State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, ul. Krasnogo Vosstaniya, 1, Irkutsk 664003, Russia

³ Novosibirsk Testing Laboratory, Federal Centre for Animal Health, ul. Serebrennikovskaya, 5, Novosibirsk 630007, Russia

ABSTRACT

Introduction. The Novosibirsk Oblast is classified as a rabies-endemic region within the Siberian Federal District of the Russian Federation, ranking first in the number of reported cases among all constituent territories of the district. However, there is a notable lack of research on the genetic properties of the rabies virus field isolates.

© Чупин С. А., Чернышова Е. В., Ботвинкин А. Д., Зарва И. Д., Чвала И. А., Назаров Н. А., Грехнева А. Д., Чередникова И. М., Тимофеева М. А., 2026

Objective. This study seeks to assess how rabies outbreaks in the rabies endemic Novosibirsk Oblast are connected with those in the neighbouring regions, by analyzing genetic diversity of rabies virus variants and their spatial distribution.

Materials and methods. Two overlapping genome fragments containing full-size nucleoprotein (N) gene of rabies virus were Sanger-sequenced following purification, using a previously established procedure. Phylogenetic analysis was performed using a Bayesian approach as implemented in the Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees (BEAST X) software package.

Results. The number of registered animal rabies cases after 2012 declined markedly and has not exceeded 60 cases per year. All the studied isolates belong to genetic group C. The isolates are classified into two genetic clusters – C2c (35 isolates) and C2b (18 isolates). One of the rabies virus isolates was recovered in mouse neuroblastoma cell culture. All group C clusters found in the Novosibirsk Oblast have previously been reported in Kazakhstan as well. The most stable connections are observed within the East Kazakhstan (Clusters C2c, C1b) and North Kazakhstan (Clusters C2c, C2b) Oblasts. Results of the phylogenetic analysis are consistent with earlier descriptions of “fox” rabies and with the findings of epizootiological monitoring in adjacent territories of Western Siberia and Kazakhstan.

Conclusion. At present, two independently derived virus clusters – C2b and C2c – are circulating in the Novosibirsk Oblast.

Keywords: rabies virus, phylogenetic analysis, genetic group C, the Novosibirsk Oblast

Acknowledgements: The work was supported by the Federal Centre for Animal Health within the framework of scientific research on the topic “Animal Disease Freedom”.

For citation: Chupin S. A., Chernyshova E. V., Botvinkin A. D., Zarva I. D., Chvala I. A., Nazarov N. A., Grekhneva A. D., Cherednikova I. M., Timofeeva M. A. Phylogenetic analysis of rabies virus isolates recovered in the Novosibirsk Oblast (the Russian Federation). *Veterinary Science Today*. 2026; 15 (3): 252–261. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-252-261>

Conflict of interests: Chvala I. A. is a member of the editorial board of the “Veterinary Science Today” journal, but was not involved into the decision-making process concerning the publication of this paper. The manuscript has passed the review procedure accepted in the journal. The authors did not declare any other conflicts of interests.

For correspondence: Sergei A. Chupin, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Reference Laboratory for Rabies and BSE, Federal Centre for Animal Health, ul. Gvardeyskaya, 6, Yur'evets, Vladimir 600901, Russia, chupin@arriah.ru

ВВЕДЕНИЕ

Новосибирская область относится к числу энзоотичных по бешенству субъектов Российской Федерации Сибирского федерального округа, лидируя по числу регистрируемых случаев среди других субъектов округа. Заболевания животных бешенством на протяжении десятилетий регистрируются ежегодно [1, 2, 3]. Наиболее неблагоприятные по бешенству территории Новосибирской области являются частью Западно-Сибирско-Казахстанского степного и лесостепного очагового региона; участки на правом берегу р. Оби отнесены к очаговому региону горных областей Южной и Восточной Сибири [4]. В настоящее время преобладают эпизоотии природного типа, основным резервуаром инфекции служит лисица (*Vulpes vulpes*), в степных районах на юге области в распространении бешенства участвует также хорька (*Vulpes corsac*). Бешенство других диких животных регистрируется значительно реже [5].

Бешенство среди лисиц в Новосибирской области впервые отмечено в 1957 г. – раньше, чем в других районах Сибири, и уже тогда предполагалось, что оно проникло в южную часть области из Казахстана [6, 7, 8]. В 1958 г. в одном из сельских районов описан первый в Сибири случай заболевания человека в результате заражения от лисицы [9]. Позднее благодаря использованию молекулярно-генетических методов установлено, что на юге Сибири от Урала до Забайкалья, а также на сопредельных территориях Казахстана, Монголии и Китая распространены степной (стерре) вариант вируса бешенства (генетическая группа С) клады *Cosmopolitan* [10, 11, 12]. К настоящему времени для этой обширной территории накоплены данные о структуре генома большого количества изолятов вируса бешенства, однако

Новосибирская область была представлена в GenBank всего одной полноразмерной последовательностью гена нуклеопротеина (гена N), принадлежащей изоляту RVHN [10].

Относительно недавно опубликована статья, в которой на основе анализа пространственного распространения эпизоотий в Новосибирской области в очередной раз обосновывалась резервуарная роль мелких наземных млекопитающих без каких-либо вирусологических подтверждений [13] и без учета ранее опубликованных данных [1]. В 1998 г. отмечено проникновение в Новосибирскую область енотовидной собаки (*Nyctereutes procyonoides*), которая расселилась от западных до восточных границ региона, включая правобережье р. Оби [14, 15]. Не исключено, что вместе с енотовидной собакой в Новосибирскую область могли распространиться варианты вируса бешенства из западных регионов Российской Федерации.

Новосибирская область расположена на юго-востоке Западно-Сибирской низменности и занимает площадь около 178 тыс. км². Здесь преобладают лесостепные и степные равнинные ландшафты, на леса приходится около 26% территории. Характер ландшафтов, состав флоры и фауны резко изменяются в предгорьях Салаирского кряжа на правобережье р. Оби, далее на востоке преобладают таежные леса и горный рельеф. Новосибирское водохранилище (Обское море) имеет протяженность около 200 км – от слияния р. Катунь и Бии в Алтайском крае до г. Новосибирска¹.

¹ Физико-географическое описание территории Новосибирской области. <https://docs.cntd.ru/document/465709672/titles/3P22BOP>

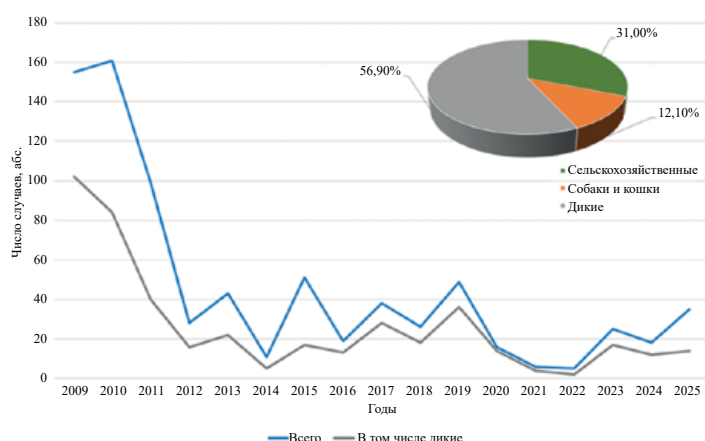


Рис. 1. Динамика числа зарегистрированных случаев бешенства животных в Новосибирской области (всего, в том числе диких) и структура заболеваемости бешенством по категориям животных (суммарно за 2009–2025 гг., $n = 770$)

Fig. 1. Trends in the number of reported rabies cases in animals in the Novosibirsk Oblast (all animals, including wildlife), 2009–2025, and distribution of cases by animal category (cumulative data; $n = 770$)

Новосибирская область граничит с энзоотичными по бешенству территориями Омской области на западе, с Казахстаном на юго-западе и Алтайским краем на юге. Имеются основания полагать, что бешенство из Новосибирской области периодически проникало в соседние регионы, где оно регистрировалось с многолетними перерывами: в расположенную севернее Томскую область, а на востоке – в Кемеровскую область и далее, в Красноярский край и Хакасию [16, 17]. В связи с изложенными выше фактами имеются веские основания для проведения филогенетического анализа изолятов вируса бешенства с этой территории.

Цель – оценить связи эпизоотий бешенства на энзоотичной территории Новосибирской области с соседними регионами на основе анализа генетического разнообразия вариантов вируса бешенства и их пространственного распределения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Статистические данные о бешенстве животных в Новосибирской области по годам и видам животных за 2008–2025 гг. ($n = 770$) получены из ФГБУ «Центр ветеринарии».

Образцы головного мозга от животных ($n = 53$) получены в рамках сотрудничества по НИР из Новосибирской испытательной лаборатории ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»). Характеристики образцов (названия изолятов, дата и место выявления, вид животного и др.) представлены в электронном виде в разделе *Дополнительные файлы* по адресу <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-252-261>.

Наличие РНК вируса бешенства в предоставленных образцах определяли с помощью тест-системы для выявления фрагмента генома вируса бешенства методом совмещенной обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени «Бешенство-С-ОТ-ПЦР» производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир) согласно инструкции по применению.

Выделение РНК из головного мозга животных и наработку в ОТ-ПЦР двух перекрывающихся фрагментов генома, содержащих полноразмерный ген N вируса бешенства, с последующей очисткой и нуклеотидным секвенированием по Сэнгеру осуществляли согласно ранее опубликованному протоколу [18].

Поиск родственных нуклеотидных последовательностей в GenBank осуществлялся с помощью онлайн-сервиса BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

При выполнении филогенетического анализа использовали байесовский подход с применением пакета программ Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees (BEAST X) [19]. Предварительно с помощью компьютерной программы MEGA version 12.1 [20] оценивали модель, подходящую для построения филогенетического дерева, с определением байесовского коэффициента (BIC) и скорректированного коэффициента Акаике (AICc). По результатам теста была выбрана модель GTR + G + I (BIC = 21643,362; AICc = 17230,494). Филогенетическое дерево, отражающее апостериорную (эмпирическую, posterior) вероятность времени образования внутренних (предковых) и терминальных узлов с 95%-м доверительным интервалом (95%-й ДИ), конструировали методом «нестрогих молекулярных часов», устанавливая гетерохронную калибровку до года выделения образца, модель случайного начального дерева с постоянным размером популяции, длину марковской цепи Монте-Карло (MCMC) 1×10^8 с частотой дискретизации 1×10^5 . Апостериорную прогностическую проверку проводили для всех таксонов, принадлежащих генетической группе С вируса бешенства.

Достоверность MCMC оценивали в программе Tracer при анализе выходных данных BEAST X [21].

Дерево аннотировали с помощью утилиты TreeAnnotator и установленными параметрами устранения выбросов (burn-in = 10%, 10 000 000 состояний), максимальной достоверности клад (MCC) и сохранения заданной длины.

Визуализацию филогенетического дерева выполняли в программе FigTree v.1.4.5 [22].

Для классификации изолятов использован подход, предложенный А. А. Deviatkin et al., в котором предлагалось разделить группу С на более мелкие таксоны – подгруппы C0, C1 и C2 и кластеры C1a, C1b, C2a, C2b и C2c [11].

Для культивирования полевого изолята вируса бешенства использовали культуру клеток нейробластомы мыши N2a из коллекции ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир). Культивирование проводили согласно «Методическим указаниям по выделению вируса бешенства в культуре клеток нейробластомы мыши» [23]. Для окрашивания применяли антирабический флуоресцирующий иммуноглобулин «Флураб» производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир). Инфекционную активность определяли методом титрования вируса в культуре клеток N2a [24].

Для картографирования использовали электронную ландшафтно-географическую карту Natural Earth и программу QGIS 3.2.1. Географические координаты точек сбора изолятов вируса бешенства определены по расположению ближайших населенных пунктов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Количество зарегистрированных заболеваний животных бешенством после 2012 г. заметно снизилось и не превышало 60 случаев в год. Более половины

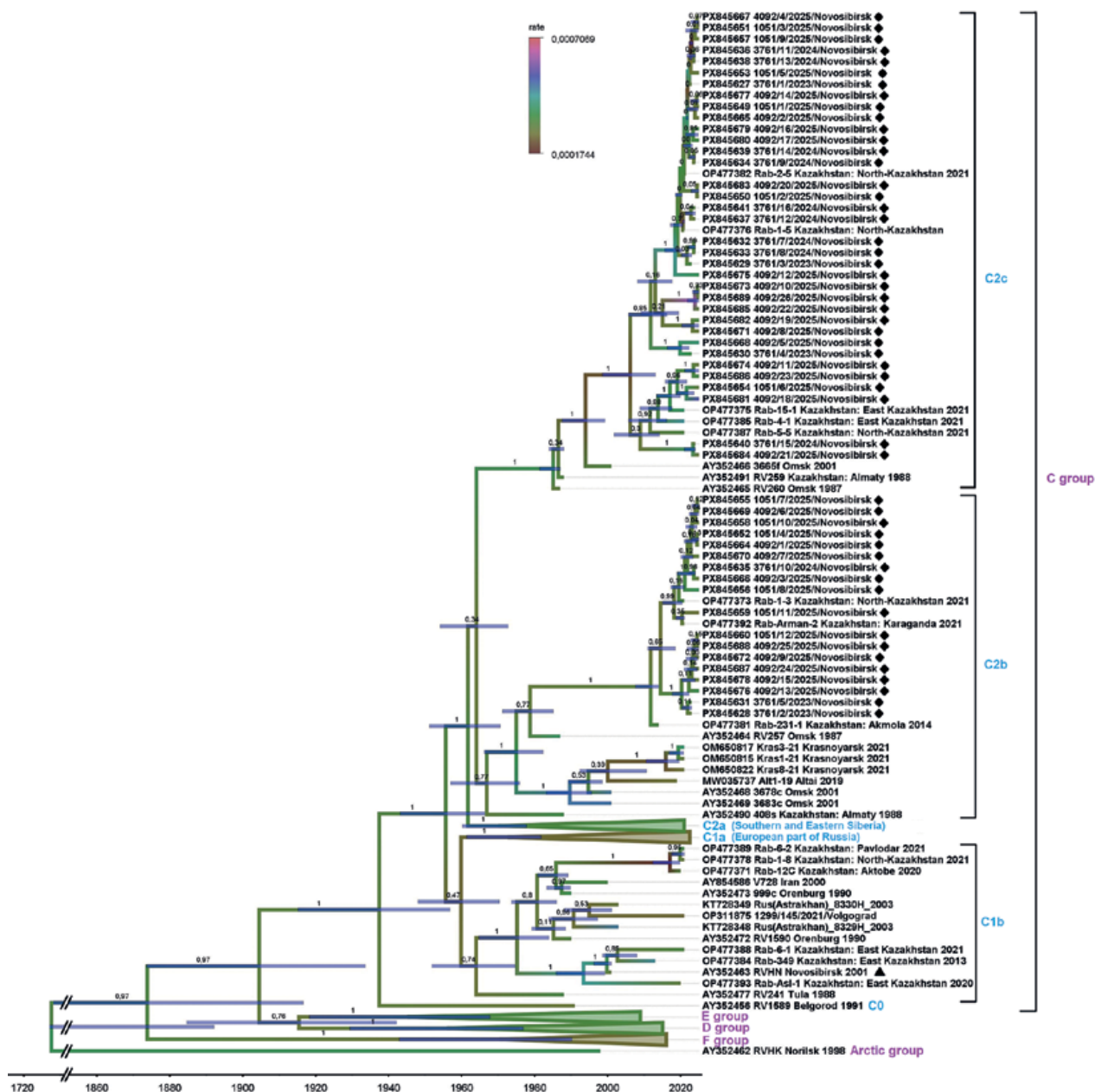


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное с использованием полноразмерной нуклеотидной последовательности гена *N* вируса бешенства и алгоритма «нестрогих молекулярных часов»

Примечание: Цифрами (от 0 до 1) над ветвями дерева даны значения апостериорной вероятности выделения той или иной группы. Цветом ветвей показана скорость фиксации нуклеотидных замен (расшифровка цвета дана на дополнительной шкале). Горизонтальная временная шкала внизу показывает год существования последнего общего предка для той или иной группы, в узлах дерева сиреневой полосой показаны 95%-е доверительные интервалы для этого значения. Черными ромбами маркированы изучаемые изоляты, черным треугольником – ранее изученный изолят RVHN из Новосибирской области. Розовым шрифтом подписаны генетические группы, голубым – генетические подгруппы и кластеры.

Fig. 2. Phylogenetic tree based on the full-length rabies virus *N* gene nucleotide sequences and the "relaxed molecular clock model"

Note: The numbers (0–1) shown above the branches denote posterior probability values for the corresponding clades. Branch colors reflect the rate of nucleotide substitution fixation, with the color legend provided in the adjacent scale. The horizontal time axis at the base of the tree denotes the time to the most recent common ancestor for each respective clade; 95% confidence intervals are represented by purple bars at the nodes. The isolates from this study are shown as black diamonds, and the previously characterized isolate RVHN from the Novosibirsk Oblast is indicated by a black triangle. Genetic groups are denoted in pink text, whereas genetic subgroups and clusters are represented in blue.

из них приходилось на диких животных и лишь около 12% – на домашних плотоядных (рис. 1). Из всех случаев регистрации бешенства среди сельскохозяйственных животных более 80% приходится на крупный рогатый скот.

Образцы головного мозга животных, собранные в 2023–2025 гг., исследованы с помощью ПЦР; наличие вируса бешенства было установлено во всех образцах. Распределение изолятов вируса для филогенетиче-

ского анализа по видам животных примерно соответствовало структуре заболеваемости: дикие животные – 47,1%, сельскохозяйственные животные – 35,8%, домашние плотоядные – 17,0%. В группе диких животных преобладали изоляты от лисиц – 23 (43,4% от общего количества изолятов), по 1 изоляту было от корсака и енотовидной собаки (по 1,9%).

Около 23,0% изолятов собрано в лесостепи севернее оз. Чаны и группы других крупных озер

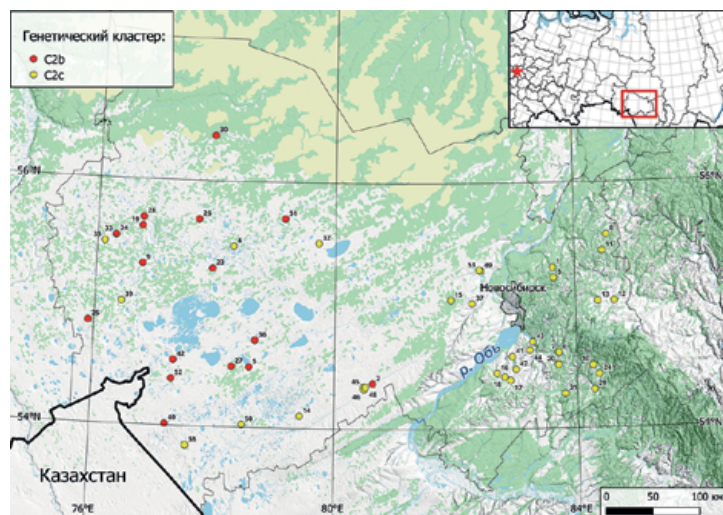


Рис. 3. Распространение генетических кластеров вируса бешенства на территории Новосибирской области

Примечание: Номера на карте соответствуют номерам изолятов (см. раздел «Дополнительные файлы»: <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-252-261>). Открытые степные и лесостепные пространства показаны светлой заливкой.

Fig. 3. Spatial distribution of rabies virus genetic clusters across the Novosibirsk Oblast

Note: The numbers on the map correspond to the isolate numbers (see the "Supplementary Files" section: <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-252-261>). Steppe and forest-steppe areas are highlighted with a light background fill.

в центральной части Новосибирской области, 26,0% происходит из Кулундинской степи, граничащей с Павлодарской областью Казахстана и Алтаем. Большая группа (36,0%) – изоляты с правобережья р. Оби. Таким образом, представлены основные неблагоприятные по бешенству природно-климатические зоны.

Для всех изолятов вируса бешенства была определена полноразмерная нуклеотидная последовательность гена N (1353 н. о.). Полученные последовательности депонировали в международную базу данных GenBank (номера доступа в GenBank представлены в таблице, размещенной в разделе *Дополнительные файлы* по адресу <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-252-261>).

На основе полноразмерной нуклеотидной последовательности гена N был проведен филогенетический анализ изолятов вируса бешенства с применением байесовских филогенетических методов. Согласно предварительному анализу, все изученные изоляты из Новосибирской области отнесены нами к генетической группе С (степная) вируса бешенства по классификации, предложенной I. V. Kuzmin et al. [10]. Поэтому для филогенетического анализа из базы данных GenBank были получены полноразмерные последовательности всех имеющихся изолятов этой группы, выявленных на территории РФ с известным годом выявления (за исключением идентичных или близкородственных, с генетическим родством более 99%, изолятов). Кроме того, поиск с помощью онлайн-сервиса BLAST позволил определить близкородственные изоляты, выявленные в Казахстане и Иране, которые также были включены в анализ.

Для наглядного представления группы С среди других генетических вариантов вируса бешенства были включены по несколько изолятов из других генетических групп, чей ареал перекрывается с территорией России (кроме представителей генетических групп

Arctic и *Arctic-like* ввиду очень отдаленного генетического родства). Таким образом, в филогенетический анализ было включено 206 полноразмерных последовательностей гена N вируса бешенства, из них 194 последовательности относились к представителям генетической группы С, по три изолята – к группам D и E, пять изолятов – к группе F. В качестве корня был использован изолят RVHK, относящийся к группе *Arctic* [10, 18, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31].

В результате филогенетического анализа было построено дерево, представленное на рисунке 2. Для лучшей читаемости рисунка группы изолятов, не имеющих близкого генетического родства с изучаемыми изолятами, были «свернуты».

Из 53 изучаемых 35 образывали группы идентичных изолятов (от 2 до 14 в группе). Остальные 18 изолятов были уникальны. Впервые изученные в данном исследовании изоляты (обозначены ромбами на рисунке 2) отчетливо распределились на 2 группы, отличия между группами составили 2,51–3,18%. В одной из групп уровень отличий между изолятами был 0,00–1,78% (на рисунке 2 – верхняя группа), а в другой – 0,00–0,67% (нижняя группа).

Топология филогенетического дерева подтверждает, что все изученные изоляты относятся к генетической группе С. При сравнении с ранее охарактеризованными вирусами изучаемые изоляты классифицируются в два генетических кластера – C2c (35 изолятов) и C2b (18 изолятов). Точки выявления изолятов с указанием кластеров представлены на рисунке 3.

К изолятам из Новосибирской области, относящимся к кластеру C2b, генетически близки изоляты из Северо-Казахстанской, Карагандинской (выявлены в 2021 г.) и Акмолинской (выявлен в 2014 г.) областей Казахстана [25]. Внутри кластера они образуют генетически однородную группу с родством между собой не менее 99,33%. Предположительно, эта группа возникла относительно недавно, в 2011 г. (2007,8–2013,9 гг., учитывая 95%-й ДИ). Группа поддержана высокой оценкой апостериорной вероятности – 1,0. В целом же кластер C2b возник, предположительно, в 1974 г. (1966,4–1982,7 гг.).

Изоляты, относящиеся к кластеру C2b, были выявлены в Новосибирской области только в междуречье р. Оби и Иртыша, преимущественно в западной части области, но не найдены на правом берегу р. Оби (рис. 3). В то же время кластер C2b содержит изоляты, выявленные в Омской области, Алтайском и Красноярском краях, а также в Алматинской области Казахстана, но имеющие более отдаленное родство с новосибирскими изолятами (от 2,14 до 2,88%).

В рамках кластера C2c выделяется группа, поддержанная высоким значением апостериорной вероятности (1,0), включающая изоляты, выявленные в Новосибирской области, и пять изолятов, выявленных в Казахстане в 2021 г. в Северо-Казахстанской и Восточно-Казахстанской областях. Предположительно, эта группа возникла в 2006 г. (1999,1–2013,0 гг.). Изоляты кластера C2c выявлялись от западных до восточных границ в Новосибирской области (рис. 3). Кроме того, в кластере C2c присутствуют изоляты из Омской области России и Алматинской области Казахстана, но они имеют более отдаленное родство с изолятами из Новосибирской области (0,52–1,26%). Предположительно, кластер C2c возник в 1984 г. (1981,4–1987,0 гг.).

Средняя скорость фиксации нуклеотидных замен для кластера C2c составила $3,11 \times 10^{-4}$ (95%-й ДИ, $2,48-3,83 \times 10^{-4}$) замен на сайт в год, для кластера C2b – $3,14 \times 10^{-4}$ (95%-й ДИ, $2,46-3,87 \times 10^{-4}$) замен на сайт в год.

Один из выявленных в 2025 г. изолятов вируса бешенства, 1051/11/2025/Novosibirsk, выделен в культуре клеток нейробластомы мыши и прошел 12 последовательных пассажей. В ходе адаптации вируса в культуре клеток наблюдали значительное снижение количества фокусов инфицированных клеток в 2-м и 3-м пассажах относительно 1-го пассажа с последующим увеличением количества фокусов в дальнейших пассажах, что может указывать на гетерогенность микропопуляции вируса в конкретном изоляте. В 12-м пассаже степень инфицирования монослоя достигла около 70%, поэтому 13-й пассаж был проведен с целью масштабирования полученного штамма вируса, оценки его инфекционной активности и депонирования. Инфекционная активность полученного штамма вируса бешенства составила 6,12 TCID₅₀/мл. Данный вирус депонирован во Всероссийскую государственную коллекцию экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир) как штамм вируса бешенства «RV/RU/Novosibirsk/1051-11/Fox/2025».

ОБСУЖДЕНИЕ

В статье впервые приведены результаты филогенетического анализа представительной выборки ($n = 53$) полных последовательностей гена нуклеопротеина вируса бешенства (1353 н. о.) с территории одного из наиболее неблагополучных субъектов Сибирского федерального округа, ранее крайне скудно охарактеризованного в этом отношении. На момент проведения исследования в GenBank имелась только одна опубликованная полноразмерная последовательность гена N изолята вируса бешенства из Новосибирской области – изолята RVHN, выявленного в 2001 г. у человека [10].

В Новосибирской области достоверно подтверждена циркуляция нескольких кластеров степного (steppe) варианта вируса бешенства (генетическая группа C), которая входит в состав генетической клады *Cosmopolitan*. Доминирование этой группы вируса бешенства было вполне ожидаемым, так как она наиболее распространена на территории Российской Федерации, в том числе в соседних с Новосибирской областью степных и лесостепных ландшафтах Омской области, Алтайского края и Казахстана [10, 11, 25] и далее на восток – в Хакасии, на юге Красноярского края и Забайкалья [11, 16]. Однако генетическое разнообразие в пределах группы C оказалось низким. В Новосибирской области выявлено всего три кластера, встречавшихся с разной частотой: C2c – 64,8%, C2b – 33,3%, C1b – 1,9%. При этом среди изолятов, собранных в 2023–2025 гг., обнаружены только первые два; кластер C1b представлен единственным изолятом 2001 г. По нашему мнению, относительно низкая генетическая гетерогенность вирусной популяции объясняется расположением Новосибирской области на северо-восточной периферии ареала генетической группы C. В недавно выполненном аналогичном исследовании для территории Волгоградской области генетическое разнообразие изолятов было значительно выше [26].

Новосибирские изоляты кластера C2c проявляют высокое родство и в некоторых случаях идентичность между собой, а также с изолятами, выявленными в Казахстане, и чуть меньшее родство с изолятами из Омской области. Они распространены на всей южной части Новосибирской области. В междуречье Оби и Иртыша представители этого кластера выявлены преимущественно вдоль южной границы Новосибирской области, а на юго-востоке отмечены вблизи Новосибирска на левом берегу р. Оби (в том числе изолят от енотовидной собаки). Только 12,1% всех изолятов кластера C2c выявлено на западе недалеко от границ с Омской областью. Опубликованы данные о находках изолятов этого кластера в Омской области в 2001–2009 гг. и в Казахстане (в районе г. Алма-Аты) в 1988 г. [10, 11].

Изоляты из Новосибирской области, относящиеся к кластеру C2b, также проявляют высокое родство или идентичность между собой и с изолятами из Казахстана, но не имеют близких родственников в Омской области. Они обнаружены преимущественно в западной части Новосибирской области, характеризующейся равнинными лесостепными ландшафтами и обилием озер. Ранее описанные находки этого кластера на Алтае, в Омской области и Казахстане относятся к 2008–2014 гг., а наиболее ранняя, в восточной части Казахстана, датирована 1988 г. Только один изолят обнаружен севернее 56° с. ш. на стыке лесостепи и тайги. В таежной зоне на севере Новосибирской области бешенство в этот период регистрировалось редко.

Особенности ландшафтного распределения изолятов вируса бешенства, по-видимому, связаны с различиями в численности населения естественных хозяев вируса бешенства. Основная часть исследованных изолятов от диких животных получена от лисиц (25 из 27) и лишь единичные изоляты – от корсака и енотовидной собаки. Численность лисицы наиболее высока в лесостепи в центральной и южной частях области и составляет 12–16 тыс. особей. Корсак распространен на незначительных по площади степных территориях, граничащих с Казахстаном, и его численность значительно меньше – 2,2–2,7 тыс. особей [32]. Енотовидная собака распространяется с запада на восток преимущественно по южной лесостепи и на недавно заселенных участках встречается спорадически. По данным учетов, ее общая численность в области составляет всего около 400 особей [15]. Распространение всех этих видов в таежную зону лимитируется высоким и рыхлым снежным покровом [8]. В совокупности эти данные подтверждают, что в качестве основного резервуара вируса бешенства в Новосибирской области в настоящее время является лисица. Изоляты от енотовидной собаки и корсака генетически близки к изолятам от лисиц из тех же районов.

Возникновение групп внутри кластеров C2c и C2b, объединяющих новосибирские и казахские изоляты, произошло недавно: C2c – предположительно в 2006 г., C2b – в 2011 г.

Кластер C1b представлен одним изолятом, локализация которого точно не установлена. Он был выделен в 2001 г. и генетически значительно отличается от всех новосибирских изолятов последних лет (более чем на 2,37%). О распространении этого кластера в Новосибирской области в прошлом ничего

не известно. Но описаны изоляты этого кластера, обнаруженные в Астраханской (2003 г.) [33], Оренбургской (1990 г.), Тульской (1988 г.) [10], Волгоградской (2021 г.) [26] областях, а также в Иране (2000 г.) [27]. Кроме того, по результатам анализа нуклеотидных последовательностей гена нуклеопротеина длиной 1110 н. о. установлено его присутствие в Омской области в 2008 и 2009 гг., Казахстане и Китае в 2013–2014 гг. [11].

Согласно нашему анализу, кластер возник, предположительно, в 1962 г. (1948,9–1975,0 гг.). Изолят RVHN наибольшее сходство (99,33%) проявляет внутри кластера C1b с двумя изолятами (Rb-349 и Rab-6-1), выявленными в Восточно-Казахстанской области в 2013 и 2021 гг. соответственно [25].

Таким образом, представители всех кластеров группы С, выявленных в Новосибирской области, и раньше обнаруживались в Казахстане. Наиболее устойчивые связи прослеживаются с Восточно-Казахстанской (кластеры C2c, C1b) и Северо-Казахстанской (кластеры C2c, C2b) областями. Кластер C1b продолжает циркулировать преимущественно на территориях, расположенных южнее государственной границы России. Генетически близкие изоляты кластеров C2c, C2b обнаружены в соседних с Новосибирской областью регионах РФ – в Омской области, Алтайском и Красноярском краях. Как показывают результаты нашего анализа, изоляты вируса бешенства, выявленные к востоку от Новосибирской области – в республиках Тыва, Хакасия, на юге Красноярского края, в Бурятии и Забайкальском крае, – имеют относительно отдаленное генетическое родство с изолятами из Новосибирской области (96,60–98,15%), хотя и относятся к кластеру C2a.

Результаты филогенетического анализа согласуются с ранними описаниями «лисьего» бешенства и с результатами эпизоотологического мониторинга на сопредельных территориях Западной Сибири и Казахстана в современный период. Эпизоотии среди лисиц стали регистрироваться здесь с 1957 г.; первые заболевания людей бешенством после укусов лисиц выявлены в Новосибирской области и Казахстане одновременно – в 1958 г. [6, 9, 34]. Для степей Казахстана и юга Западной Сибири характерны сезонные миграции лисиц и корсаков в широтном направлении, что при отсутствии естественных барьеров определяет тесную связь природных очагов бешенства на смежных территориях [1, 4, 8]. Омская, Новосибирская области и Алтайский край имеют протяженную границу с Павлодарской и Восточно-Казахстанской областями Казахстана, которые отнесены к зоне повышенного риска по бешенству [35, 36]. В 2013–2025 гг. в Казахстане было зарегистрировано 985 случаев бешенства у животных [36]. Энзоотичность территории и значительная доля диких и сельскохозяйственных животных в структуре заболеваемости свидетельствуют о преобладании эпизоотий природного типа.

Сопоставление пространственного распространения бешенства в Казахстане [35, 37] с данными по Новосибирской области (рис. 3) позволяет обозначить основные направления распространения вируса бешенства между этими территориями. Очевидно, что обмен возбудителем между Павлодарской областью Казахстана, Новосибирской и Омской обла-

стями России происходит непосредственно через государственную границу. Периодические миграции лисицы и корсака в зимнее время из степи в лесостепные районы связаны с колебаниями численности мышевидных грызунов и возможностей кормодобывания из-за состояния снежного покрова [8]. Пойма р. Иртыша рассматривалась в качестве пути для миграций лисиц и распространения бешенства между Павлодарской областью Казахстана и Омской областью России [1, 8]. Из восточной части Казахстана имеются возможности для распространения вируса бешенства через Алтайский край по обеим берегам р. Оби, для которых характерны своеобразные ландшафты в виде ленточных сосновых боров. Севернее, на правом берегу р. Оби в предгорьях Салаира, распространены всхолмленные лесостепные ландшафты, благоприятные для обитания лисицы. Кормовая база и условия для ее норения здесь улучшаются за счет присутствия в фауне сурка (*Marmota kastschenkoii*) [32]. По-видимому, так в последнее время сформировалась компактная группа изолятов кластера C2c в Новосибирской области на правом берегу р. Оби. В этом направлении возможно дальнейшее распространение вируса бешенства, что подтверждается обнаружением генетически близких изолятов в сопредельных районах Красноярского края.

Результаты филогенетического анализа изолятов вируса бешенства из Новосибирской области подтверждают актуальность укрепления межгосударственного взаимодействия между соседними странами при организации мониторинга и противоэпизоотических мероприятий, включая проведение барьерной оральной вакцинации диких плотоядных. В перспективе следует предусмотреть сбор и генетический анализ изолятов вируса бешенства при возобновлении эпизоотий в Томской и Кемеровской областях РФ для установления и блокирования путей заноса бешенства на эти территории.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В Новосибирской области установлена циркуляция вируса бешенства трех кластеров генетической группы С, состоящих в близком генетическом родстве с изолятами из Казахстана и соседних субъектов Сибирского федерального округа РФ. В настоящее время на территории Новосибирской области персистируют вирусы кластеров C2b и C2c, имеющих независимое друг от друга происхождение. Для уточнения связей эпизоотического процесса на сопредельных территориях изучено пространственно-временное распределение выявленных генетических вариантов вируса бешенства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кузьмин И. В., Сидоров Г. Н., Ботвинкин А. Д., Рехов Е. И., Полещук Е. М. Бешенство на юге Западной Сибири в 1990–2000 гг.: вопросы и поиск решения. *Ветеринарная патология*. 2002; (1): 92–100. <https://elibrary.ru/gxvcij>
- Полещук Е. М., Сидоров Г. Н., Нашатырева Д. Н., Градобоева Е. А., Пакскина Н. Д., Попова И. В. Бешенство в Российской Федерации: информационно-аналитический бюллетень. Омск: Издательский центр КАН; 2019. 110 с. <https://elibrary.ru/bouwsu>
- Гулюкин А. М., Шабейкин А. А. Обзор современной эпизоотической ситуации по бешенству в Российской Федерации. Динамика изменений за 35-летний период, закономерности, влияющие факторы. *Ветеринария сегодня*. 2025; 14 (3): 232–240. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2025-14-3-232-240>

4. Мальков Г. Б. Концепция о популяционно-биологических аспектах природной очаговости бешенства. В кн.: *Природноочаговые болезни человека (вопросы эпидемиологии и профилактики): республиканский сборник научных работ*. Омск: Омский государственный медицинский институт им. М. И. Калинина; 1981; 105–115.
5. Рихтер А. С., Шилова Н. В., Чернышова Л. Ю., Юрченко Ю. А., Рубцова Е. В., Семенова Е. В. Эпидемиологическая обстановка по бешенству на территории Новосибирской области. *Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: материалы V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Ставрополь, 24–25 апреля 2024 г.)*. Ставрополь: Экспо-Медиа; 2024; 74–76. <https://elibrary.ru/yfyudi>
6. Шатко П. Д., Корнилова А. Л., Ермилов Д. К. Природные очаги бешенства в условиях Новосибирской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1963; (6): 33–38.
7. Джупина С. И., Куликов В. Т. Эпизоотология бешенства сельскохозяйственных животных в Новосибирской области. *Сборник научных работ Новосибирской научно-исследовательской ветеринарной станции*. 1968; (3): 163–166.
8. Абашкин С. А. Лисица и корсак, их распространение и численность. В кн.: *Биологическое районирование Новосибирской области (в связи с проблемой природно-очаговых инфекций): сборник статей*. Новосибирск: Наука. Сибирское отделение; 1969; 165–178.
9. Вяжнев В. К. Случай возникновения бешенства у человека при заражении от дикой лисы. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1959; (10): 146–147.
10. Kuzmin I. V., Botvinkin A. D., McElhinney L. M., Smith J. S., Orciari L. A., Hughes G. J., et al. Molecular epidemiology of terrestrial rabies in the former Soviet Union. *Journal of Wildlife Diseases*. 2004; 40 (4): 617–631. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.4.617>
11. Deviatkin A. A., Lukashev A. N., Poleshchuk E. M., Dedkov V. G., Tkachev S. E., Sidorov G. N., et al. The phylodynamics of the rabies virus in the Russian Federation. *PLoS ONE*. 2017; 12 (2): e0171855. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171855>
12. Ботвинкин А. Д., Сидоров Г. Н., Полещук Е. М., Зарва И. Д., Нашатырева Д. Н., Якович Н. В. и др. Ретроспективная оценка реализации долгосрочного прогноза пространственного распространения бешенства в азиатской части России. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (2): 13–21. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-13-21>
13. Юдкин В. А. О возможной связи популяций мелких млекопитающих с природным очагом бешенства. *Актуальные вопросы ветеринарной биологии*. 2015; (4): 53–59. <https://elibrary.ru/vbevrz>
14. Кирюхин С. Т., Тепленев В. Г., Крючков В. С., Кузнецов Э. В. Расселение енотовидной собаки по территории Новосибирской области. *Современные проблемы природопользования, охотоведения и звероводства: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 90-летию ВНИИОЗ им. проф. Б. М. Житкова (22–25 мая 2012 г.)*. Киров; 2012; 400. <https://elibrary.ru/boklms>
15. Скалон Н. В., Скалон В. Н. Енотовидная собака на юго-востоке Западной Сибири. *Охрана и рациональное использование животных и растительных ресурсов: материалы Международной научно-практической конференции, приуроченной к 120-летию со дня рождения профессора В. Н. Скалона, в рамках XII международной научно-практической конференции «Климат, экология, сельское хозяйство Евразии» (Молодежный, 24–28 мая 2023 г.)*. Часть II. Молодежный: ФГБОУ ВО Иркутский ГАУ; 2023; 179–184. <https://elibrary.ru/hgldjb>
16. Якович Н. В., Бондарюк А. Н., Адельшин Р. В., Носков А. К., Андаев Е. И., Ботвинкин А. Д. Вирус бешенства в Красноярском крае: две независимых филогруппы. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2019; (37): 38–40. <https://elibrary.ru/nkcgau>
17. Полещук Е. М., Савкина Е. С., Сидоров Г. Н. Особенности эпидемической и эпизоотической ситуации по бешенству в Российской Федерации в 2023 г. в сравнении с многолетними данными. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2025; (1): 65–73. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2025-1-65-73>
18. Chupin S. A., Sprygin A. V., Zinyakov N. G., Guseva N. A., Shcherbinin S. V., Korennoy F. I., et al. Phylogenetic characterization of rabies virus field isolates collected from animals in European Russian Regions in 2009–2022. *Microorganisms*. 2023; 11 (10): 2526. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102526>
19. Suchard M. A., Lemey P., Baele G., Ayres D. L., Drummond A. J., Rambaut A. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution*. 2018; 4 (1): vey016. <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>
20. Stecher G., Suleski M., Tao Q., Tamura K., Kumar S. MEGA 12.1: Cross-platform release for macOS and Linux operating systems. *Journal of Molecular Evolution*. 2026; 94: 14–18. <https://doi.org/10.1007/s00239-025-10287-z>
21. Rambaut A., Drummond A. J., Xie D., Baele G., Suchard M. A. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*. 2018; 67 (5): 901–904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
22. Sauvage T., Plouviez S., Schmidt W. E., Fredericq S. TREE2FASTA: a flexible Perl script for batch extraction of FASTA sequences from exploratory phylogenetic trees. *BMC Research Notes*. 2018; 11:164. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3268-y>
23. МУ 35-16 Методические указания по выделению вируса бешенства в культуре клеток нейробластомы мыши: утв. Россельхознадзором 06.06.2016. Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2016. 19 с.
24. Назаров Н. А., Киселева В. В., Чернышова Е. В. Методические рекомендации по определению инфекционной активности вируса бешенства методом титрования в культуре клеток. Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2024. 29 с.
25. Yessembekova G. N., Xiao Sh., Abenov A., Karibaev T., Shevtsov A., Asylulan A., et al. Molecular epidemiological study of animal rabies in Kazakhstan. *Journal of Integrative Agriculture*. 2023; 22 (4): 1266–1275. <https://doi.org/10.1016/j.jia.2022.11.011>
26. Чулин С. А., Чернышова Е. В., Чернышев Р. С., Груздев К. Н., Спиридонов А. Н., Варкентин А. В. и др. Филогенетический анализ изолятов вируса бешенства, выделенных от животных на территории Волгоградской области. *Ветеринария сегодня*. 2025; 14 (3): 241–248. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2025-14-3-241-248>
27. Nadin-Davis S. A., Simani S., Armstrong J., Fayaz A., Wandeler A. I. Molecular and antigenic characterization of rabies viruses from Iran identifies variants with distinct epidemiological origins. *Epidemiology and Infection*. 2003; 131 (1): 777–790. <https://doi.org/10.1017/s095026880300863x>
28. Adelshin R. V., Melnikova O. V., Trushina Y. N., Botvinkin A. D., Borisova T. I., Andaev E. I., et al. A new outbreak of fox rabies at the Russian-Mongolian border. *Virologica Sinica*. 2015; 30 (4): 313–315. <https://doi.org/10.1007/s12250-015-3609-0>
29. Poleshchuk E. M., Deviatkin A. A., Dedkov V. G., Sidorov G. N., Ochkasova J. V., Hodjakova I. A., et al. Complete genome sequences of four virulent rabies virus strains isolated from rabid animals in Russia. *Genome Announcements*. 2013; 1 (3): e00140-13. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00140-13>
30. Bourhy H., Kissi B., Audry L., Smreczak M., Sadkowska-Todys M., Kulonen K., et al. Ecology and evolution of rabies virus in Europe. *Journal of General Virology*. 1999; 80 (10): 2545–2557. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-10-2545>
31. Condori R. E., Kartskhia N., Avaliani L., Donduashvili M., Elbakidze T., Kapanadze A., et al. Comparing the genetic typing methods for effective surveillance and rabies control in Georgia. *Frontiers in Microbiology*. 2023; 14:1243510. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1243510>
32. Чернобай Л. П., Чернобай О. Л. Особо охраняемые природные территории Новосибирской области. *Растительный и животный мир. Вестник Новосибирского государственного педагогического университета*. 2014; 4 (2): 175–187. <https://doi.org/10.15293/2226-3365.1402.16>
33. Dedkov V. G., Lukashev A. N., Deviatkin A. A., Kuleshov K. V., Safonova M. V., Poleshchuk E. M., et al. Retrospective diagnosis of two rabies cases in humans by high throughput sequencing. *Journal of Clinical Virology*. 2016; 78: 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.03.012>
34. Сансызбаев Б. К. Некоторые эпизоотологические и эпидемиологические аспекты бешенства в Казахстане. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1975; (5): 139–140.
35. Mukhanbetkaliyeva A. A., Kabzhanova A. M., Kadyrov A. S., Mukhanbetkaliyev Y. Y., Bakishev T. G., Bainiyazov A. A., et al. Application of modern spatio-temporal analysis technologies to identify and visualize patterns of rabies emergence among different animal species in Kazakhstan. *Geospatial Health*. 2024; 19 (2):1290. <https://doi.org/10.4081/gh.2024.1290>
36. Abdrakhmanov S. K., Abenova A. Z., Mukhanbetkaliyeva A. A., Korennoy F. I., Perez A. M. Animal rabies in Kazakhstan: stable endemicity, surveillance pitfalls, and priority actions. *Pathogens*. 2025; 14 (11):1079. <https://doi.org/10.3390/pathogens14111079>
37. Kabzhanova A. M., Kadyrov A. S., Mukhanbetkaliyeva A. A., Yessembekova G. N., Mukhanbetkaliyev Y. Y., Korennoy F. I., et al. Rabies in the Republic of Kazakhstan: spatial and temporal characteristics of disease spread over one decade (2013–2022). *Frontiers in Veterinary Science*. 2023; 10:1252265. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1252265>

REFERENCES

3. Gulyukin A. M., Shabeykin A. A. Rabies in the Russian Federation: a 35-year review of trends, patterns, and influencing factors. *Veterinary Science Today*. 2025; 14 (3): 232–240. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2025-14-3-232-240>
4. Malkov G. B. Kontseptsiya o populyatsionno-biologicheskikh aspektakh prirodnoi ochagovosti beshenstva = The concept of population and biological aspects of rabies sylvatic cycle. In: *Human Diseases with a Sylvatic Cycle (Issues of Epidemiology and Prevention): Republican Collection of Scientific Works*. Omsk: Mikhail Kalinin Omsk State Medical Institute; 1981; 105–115. (in Russ.)
5. Rikhter A. S., Shilova N. V., Chernyshova L. Yu., Yurchenko Yu. A., Rubtsova E. V., Semenova E. V. Epidemiologicheskaya obstanovka po beshenstvu na territorii Novosibirskoi oblasti = The epidemiological situation regarding rabies in the Novosibirsk Oblast. *Aktual'nye problemy boleznei, obshchikh dlya cheloveka i zhivotnykh: materialy V Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem (Stavropol', 24–25 aprelya 2024 g.) = Current Issues of Zoonotic Diseases: Proceedings of the V All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation (Stavropol, April 24–25, 2024)*. Stavropol: Ehkspos-Media; 2024; 74–76. <https://elibrary.ru/yfyudi> (in Russ.)
6. Shat'ko P. D., Kornilova A. L., Ermilov D. K. Prirodnye ochagi beshenstva v usloviyakh Novosibirskoi oblasti = Sylvatic rabies outbreaks in the Novosibirsk Oblast. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 1963; (6): 33–38 (in Russ.)
7. Dzhupina S. I., Kulikov V. T. Epizootologiya beshenstva sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh v Novosibirskoi oblasti = Rabies Epizootology in Farm Animals in the Novosibirsk Oblast. *Proceedings of the Novosibirsk Research Veterinary Station*. 1968; (3): 163–166. (in Russ.)
8. Abashkin S. A. The red fox and corsac fox: patterns of distribution and population density. In: *Biological Division into Districts of the Novosibirsk Region (in Relation to the Problem of Natural Focality of Diseases)*. Novosibirsk: Nauka. Siberian branch; 1969; 165–178. (in Russ.)
9. Vyazhevich V. K. Sluchai vozniknoveniya beshenstva u cheloveka pri zarazhenii ot dikoi lisy = Human rabies case following a bite from a wild fox. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 1959; (10): 146–147. (in Russ.)
10. Kuzmin I. V., Botvinkina A. D., McElhinney L. M., Smith J. S., Orciari L. A., Hughes G. J., et al. Molecular epidemiology of terrestrial rabies in the former Soviet Union. *Journal of Wildlife Diseases*. 2004; 40 (4): 617–631. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.4.617>
11. Deviatkin A. A., Lukashev A. N., Poleshchuk E. M., Dedkov V. G., Tkachev S. E., Sidorov G. N., et al. The phylogenetics of the rabies virus in the Russian Federation. *PLoS ONE*. 2017; 12 (2): e0171855. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171855>
12. Botvinkina A. D., Sidorov G. N., Poleshchuk E. M., Zarva I. D., Nashatyreva D. N., Yakovchits N. V., et al. Retrospective evaluation of implementation of rabies so-term forecast on spatial spread of rabies in the Asian part of Russia. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2020; (2): 13–21. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-13-21> (in Russ.)
13. Yudin V. A. Possible relation of small mammals populations with the natural rabies focus. *Actual Questions of Veterinary Biology*. 2015; (4): 53–59. <https://elibrary.ru/vbevzr> (in Russ.)
14. Kiruhin S. T., Telepnev V. G., Kruchkov V. S., Kuznetsov E. V. The introduction of raccoon dog on the territory of Novosibirsk Region. *Recent problems of nature use, game biology and fur farming: Proceedings of International Scientific and Practical Conference dedicated to the 90th anniversary of Russian Research Institute of Game Management and Fur Farming (May 22–25, 2012)*. Kirov; 2012; 400. <https://elibrary.ru/boklms> (in Russ.)
15. Skalon N. V., Skalon V. N. Raccoon dog in the southeast Western Siberia. *Okhrana i ratsional'noe ispol'zovanie zhivotnykh i rastitel'nykh resursov: materialy mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, priurochennoi k 120-letiyu so dnya rozhdeniya professora V. N. Skalona, v ramkakh XII mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii «Klimat, ekologiya, sel'skoe khozyaistvo Evrazii» (Molodezhny, 24–28 maya 2023 g.) = Conservation and Sustainable Use of Animal and Plant Resources: Proceedings of the International Conference Dedicated to the 120th Anniversary of Professor V. N. Skalon, held within the XII International Conference «Climate, Ecology, Agriculture of Eurasia» (Molodezhny, May 24–28, 2023)*. Part II. Molodezhny: Irkutsk State Agrarian University named after A. A. Ezhevsky; 2023; 179–184. <https://elibrary.ru/hgldjb> (in Russ.)
16. Yakovchits N. V., Bondaruk A. N., Adelshin R. V., Noskov A. K., Andae E. I., Botvinkina A. D. Rabies virus in Krasnoyarsk territory: two independent phylogroups. *Far Eastern Journal of Infectious Pathology*. 2019; (37): 38–40. <https://elibrary.ru/nkcgau> (in Russ.)
17. Poleshchuk E. M., Savkina E. S., Sidorov G. N. Features of the epidemic and epizootic situation on rabies in the Russian Federation in 2023 in comparison with long-term data. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2025; (1): 65–73. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2025-1-65-73> (in Russ.)
18. Chupin S. A., Sprygin A. V., Zinyakov N. G., Guseva N. A., Shcherbinin S. V., Korennoy F. I., et al. Phylogenetic characterization of rabies virus field isolates collected from animals in European Russian Regions in 2009–2022. *Microorganisms*. 2023; 11 (10): 2526. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102526>
19. Suchard M. A., Lemey P., Baele G., Ayres D. L., Drummond A. J., Rambaut A. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution*. 2018; 4 (1): vey016. <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>
20. Stecher G., Suleski M., Tao Q., Tamura K., Kumar S. MEGA 12.1: Cross-platform release for macOS and Linux operating systems. *Journal of Molecular Evolution*. 2026; 94: 14–18. <https://doi.org/10.1007/s00239-025-10287-z>
21. Rambaut A., Drummond A. J., Xie D., Baele G., Suchard M. A. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*. 2018; 67 (5): 901–904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
22. Sauvage T., Plouviez S., Schmidt W. E., Fredericq S. TREE2FASTA: a flexible Perl script for batch extraction of FASTA sequences from exploratory phylogenetic trees. *BMC Research Notes*. 2018; 11:164. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3268-y>
23. MU 35-16 Methodological Guidelines for the Isolation of Rabies Virus in Mouse Neuroblastoma Cell Culture: approved by Rosselkhoz nadzor on 06.06.2016. Vladimir: Federal Centre for Animal Health; 2016. 19 p. (in Russ.)
24. Nazarov N. A., Kiseleva V. V., Chernyshova E. V. Methodological Guidelines for the Assessment of Rabies Virus Infectivity by Titration in Cell Culture. Vladimir: Federal Centre for Animal Health; 2024. 29 p. (in Russ.)
25. Yessembekova G. N., Xiao Sh., Abenova A., Karibaev T., Shevtsov A., Asylulan A., et al. Molecular epidemiological study of animal rabies in Kazakhstan. *Journal of Integrative Agriculture*. 2023; 22 (4): 1266–1275. <https://doi.org/10.1016/j.jia.2022.11.011>
26. Chupin S. A., Chernyshova E. V., Chernyshev R. S., Gruzdev K. N., Spiridonov A. N., Varkentin A. V., et al. Phylogenetic analysis of rabies virus isolates recovered from animals in Volgograd Oblast. *Veterinary Science Today*. 2025; 14 (3): 241–248. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2025-14-3-241-248>
27. Nadin-Davis S. A., Simani S., Armstrong J., Fayaz A., Wandeler A. I. Molecular and antigenic characterization of rabies viruses from Iran identifies variants with distinct epidemiological origins. *Epidemiology and Infection*. 2003; 131 (1): 777–790. <https://doi.org/10.1017/S095026880300863x>
28. Adelshin R. V., Melnikova O. V., Trushina Y. N., Botvinkina A. D., Borisova T. I., Andae E. I., et al. A new outbreak of fox rabies at the Russian-Mongolian border. *Virologica Sinica*. 2015; 30 (4): 313–315. <https://doi.org/10.1007/s12250-015-3609-0>
29. Poleshchuk E. M., Deviatkin A. A., Dedkov V. G., Sidorov G. N., Ochkasova J. V., Hodjakova I. A., et al. Complete genome sequences of four virulent rabies virus strains isolated from rabid animals in Russia. *Genome Announcements*. 2013; 1 (3): e00140-13. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00140-13>
30. Bourhy H., Kissi B., Audry L., Smreczak M., Sadkowska-Todys M., Kulonen K., et al. Ecology and evolution of rabies virus in Europe. *Journal of General Virology*. 1999; 80 (10): 2545–2557. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-10-2545>
31. Condori R. E., Kartschia N., Avaliani L., Donduashvili M., Elbakidze T., Kapanadze A., et al. Comparing the genetic typing methods for effective surveillance and rabies control in Georgia. *Frontiers in Microbiology*. 2023; 14:1243510. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1243510>
32. Chernobay L. P., Chernobay O. L. Specially protected natural areas of the Novosibirsk region. Flora and Fauna. *Novosibirsk State Pedagogical University Bulletin*. 2014; 4 (2): 175–187. <https://doi.org/10.15293/2226-3365.1402.16> (in Russ.)
33. Dedkov V. G., Lukashev A. N., Deviatkin A. A., Kuleshov K. V., Safonova M. V., Poleshchuk E. M., et al. Retrospective diagnosis of two rabies cases in humans by high throughput sequencing. *Journal of Clinical Virology*. 2016; 78: 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.03.012>
34. Sansyzbaev B. K. Some epizootiological and epidemiological aspects of rabies in Kazakhstan. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 1975; (5): 139–140. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/128963> (in Russ.)
35. Mukhanbetkaliyeva A. A., Kabzhanova A. M., Kadyrov A. S., Mukhanbetkaliyev Y. Y., Bakishev T. G., Bainiyazov A. A., et al. Application of modern spatio-temporal analysis technologies to identify and visualize patterns of rabies emergence among different animal species in Kazakhstan. *Geospatial Health*. 2024; 19 (2): 1290. <https://doi.org/10.4081/gh.2024.1290>
36. Abdrakhmanov S. K., Abenova A. Z., Mukhanbetkaliyeva A. A., Korennoy F. I., Perez A. M. Animal rabies in Kazakhstan: stable endemicity, surveillance pitfalls, and priority actions. *Pathogens*. 2025; 14 (11): 1079. <https://doi.org/10.3390/pathogens14111079>
37. Kabzhanova A. M., Kadyrov A. S., Mukhanbetkaliyeva A. A., Yessembekova G. N., Mukhanbetkaliyev Y. Y., Korennoy F. I., et al. Rabies in the Republic of Kazakhstan: spatial and temporal characteristics of disease spread over one decade (2013–2022). *Frontiers in Veterinary Science*. 2023; 10:1252265. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1252265>

Поступила в редакцию / Received 17.06.2026

Поступила после рецензирования / Revised 21.07.2026

Принята к публикации / Accepted 03.08.2026

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Чупин Сергей Александрович, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник референтной лаборатории по бешенству и BSE ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-2114-5589>, chupin@arriah.ru

Sergei A. Chupin, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Reference Laboratory for Rabies and BSE, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-2114-5589>, chupin@arriah.ru

Чернышова Елена Владимировна, канд. вет. наук, заведующий референтной лабораторией по бешенству и BSE ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-4054-8532>, chernishova@arriah.ru

Elena V. Chernyshova, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Head of Reference Laboratory for Rabies and BSE, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-4054-8532>, chernishova@arriah.ru

Ботвинкин Александр Дмитриевич, д-р мед. наук, профессор кафедры эпидемиологии ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, г. Иркутск, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-1324-7374>, botvinkin_ismu@mail.ru

Aleksandr D. Botvinkin, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Department of Epidemiology, Irkutsk State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Irkutsk, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-1324-7374>, botvinkin_ismu@mail.ru

Зарва Иван Дмитриевич, канд. мед. наук, заведующий кафедрой эпидемиологии ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, г. Иркутск, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-4225-5998>, ivan_zarva@mail.ru

Ivan D. Zarva, Cand. Sci. (Medicine), Head of Department of Epidemiology, Irkutsk State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Irkutsk, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-4225-5998>, ivan_zarva@mail.ru

Чвала Илья Александрович, канд. вет. наук, заместитель директора ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>, chvala@arriah.ru

Ilya A. Chvala, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Deputy Director, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>, chvala@arriah.ru

Назаров Николай Алексеевич, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник референтной лаборатории по бешенству и BSE ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-8224-2454>, nazarov_na@arriah.ru

Nikolay A. Nazarov, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Reference Laboratory for Rabies and BSE, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-8224-2454>, nazarov_na@arriah.ru

Грехнева Алена Дмитриевна, ведущий специалист референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0009-0001-6119-0202>, grekhneva@arriah.ru

Alena D. Grekhneva, Leading Specialist, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0009-0001-6119-0202>, grekhneva@arriah.ru

Чередникова Ирина Михайловна, заместитель руководителя Новосибирской испытательной лаборатории ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Новосибирск, Россия; <https://orcid.org/0009-0004-5345-5292>, cherednikova@arriah.ru

Irina M. Cherednikova, Deputy Head of the Novosibirsk Testing Laboratory, Federal Centre for Animal Health, Novosibirsk, Russia; <https://orcid.org/0009-0004-5345-5292>, cherednikova@arriah.ru

Тимофеева Марина Александровна, руководитель Новосибирской испытательной лаборатории ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Новосибирск, Россия; <https://orcid.org/0009-0004-5420-4292>, timofeeva_ma@arriah.ru

Marina A. Timofeeva, Head of the Novosibirsk Testing Laboratory, Federal Centre for Animal Health, Novosibirsk, Russia; <https://orcid.org/0009-0004-5420-4292>, timofeeva_ma@arriah.ru

Вклад авторов: Чупин С. А. – формирование идеи, формулировка или развитие ключевых целей и задач, проведение исследований, анализ и интерпретация полученных данных, подготовка и редактирование текста; Чернышова Е. В. – принятие ответственности за все аспекты работы, целостность всех частей статьи и за ее окончательный вариант; Ботвинкин А. Д. – формирование идеи, формулировка или развитие ключевых целей и задач, анализ и интерпретация полученных данных, подготовка и редактирование текста; Зарва И. Д. – подготовка рисунков, картография; Чвала И. А. – формирование идеи, развитие ключевых целей и задач; Назаров Н. А. – выделение вируса в культуре клеток, редактирование текста; Грехнева А. Д. – секвенирование генома вируса бешенства, редактирование текста; Чередникова И. М. – сбор материала для исследования; Тимофеева М. А. – сбор материала для исследования.

Contribution of the authors: Chupin S. A. – conception of the idea, formulation or development of the key objectives and tasks, conducting research, analysis and interpretation of the obtained data, preparation and editing of the text; Chernyshova E. V. – responsible for all aspects of the work, ensuring the integrity of all parts of the article and its final version; Botvinkin A. D. – conception of the idea, formulation or development of the key objectives and tasks, analysis and interpretation of the data, preparation and editing of the text; Zarva I. D. – figure preparation, cartography; Chvala I. A. – conception of the idea, development of the key objectives and tasks; Nazarov N. A. – virus isolation in tissue culture, editing of the text; Grekhneva A. D. – rabies virus genome sequencing, editing of the text; Cherednikova I. M. – collecting research materials; Timofeeva M. A. – collecting research materials.



<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-262-272>

УДК 619:616.98:578.824.11:616-076:577.2



Разработка тест-системы для выявления генома вируса бешенства на основе ПЦР в режиме реального времени с использованием эндогенного контроля: теоретический дизайн и оптимизация

С. А. Чупин, Е. В. Чернышова, Е. А. Чуфарова

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), ул. Гвардейская, 6, мкр. Юрьевец, г. Владимир, 600901, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Бешенство в России, несмотря на снизившуюся в последние десять лет инцидентность, остается крайне актуальным заболеванием. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в разных вариантах является одним из методов обнаружения и характеристики вируса бешенства в патологическом материале. Для обеспечения надежной диагностики при разработке ПЦР должны быть учтены актуальные данные по генетическим особенностям изолятов, циркулирующих на определенной территории.

Цель исследования. Выполнение теоретического дизайна и оптимизация тест-системы на основе совмещенной обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (С-ОТ-ПЦР) для выявления фрагмента генома вируса бешенства с использованием эндогенного внутреннего контроля.

Материалы и методы. В работе использованы вакцинный штамм вируса бешенства «РВ-97» и лабораторный фиксированный штамм вируса бешенства «CVS», образцы головного мозга животных разных видов, положительные и отрицательные на вирус бешенства. Дизайн олигонуклеотидов и проверку специфичности *in silico* осуществляли с помощью онлайн-сервиса Primer Blast. Для проведения С-ОТ-ПЦР использованы реактивы НПК «Синтол» (Россия).

Результаты. В результате анализа 193 последовательностей гена N изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории России и сопредельных государств, был разработан дизайн шести праймеров и двух TaqMap-зондов. Экспериментальным путем из них были выявлены лучшие два праймера и зонд для создания тест-системы. В ходе серии экспериментов были оптимизированы такие параметры С-ОТ-ПЦР, как концентрация олигонуклеотидов, концентрация ионов магния и температура отжига. Для проведения контроля условий реакции в каждой пробирке была разработана система олигонуклеотидов для амплификации и детекции участка гена бета-актина млекопитающих. Экспериментально продемонстрирована возможность одновременного применения двух систем ПЦР в одной пробирке. Анализ 193 последовательностей гена N различных изолятов вируса бешенства показал, что разработанные олигонуклеотиды теоретически могут обеспечивать выявление подавляющего большинства вирусов, циркулирующих на территории Российской Федерации и сопредельных государств.

Заключение. Разработаны и оптимизированы основные компоненты и условия реакции тест-системы для выявления генома вируса бешенства методом С-ОТ-ПЦР с использованием эндогенного внутреннего контроля на основе гена бета-актина млекопитающих.

Ключевые слова: вирус бешенства, тест-система, ПЦР в режиме реального времени, одношаговая ОТ-ПЦР, совмещенная ОТ-ПЦР, эндогенный внутренний контроль, бета-актин, молекулярная диагностика бешенства

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

Для цитирования: Чупин С. А., Чернышова Е. В., Чуфарова Е. А. Разработка тест-системы для выявления генома вируса бешенства на основе ПЦР в режиме реального времени с использованием эндогенного контроля: теоретический дизайн и оптимизация. *Ветеринария сегодня*. 2026; 15 (3): 262–272. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-262-272>

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Чупин Сергей Александрович, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник референтной лаборатории по бешенству и BSE ФГБУ «ВНИИЗЖ», ул. Гвардейская, 6, мкр. Юрьевец, г. Владимир, 600901, Россия, chupin@arriah.ru

Development of a test system for detection of the rabies virus genome using real-time PCR with an endogenous control: Theoretical design and optimization

Sergei A. Chupin, Elena V. Chernyshova, Ekaterina A. Chufarova

Federal Centre for Animal Health, ul. Gvardeyskaya, 6, Yur'evets, Vladimir 600901, Russia

ABSTRACT

Introduction. Although rabies incidence in Russia has decreased over the past ten years, it still remains a highly relevant disease. Polymerase chain reaction (PCR) in its various modifications is one of the tools for detecting and characterizing rabies virus in pathological samples. To ensure reliable diagnosis, the current data on genetic properties of the isolates circulating in particular area should be considered when developing PCR.

© Чупин С. А., Чернышова Е. В., Чуфарова Е. А., 2026

Objective. Providing a theoretical foundation and optimizing the test system based on combined reverse transcription polymerase chain reaction (C-RT-PCR) for the detection of a rabies virus genome fragment using endogenous internal control.

Materials and methods. Rabies virus vaccine strain "RV-97" and laboratory fixed rabies virus strain "CVS", brain samples from animals of various species, both rabies virus positive and negative, were used in the work. Oligonucleotide design and *in silico* specificity testing were performed using Primer Blast online tool. Syntol reagents (Russia) were used for C-RT-PCR.

Results. As a result of the analysis of 193 N-gene sequences of rabies virus isolates circulating in Russia and neighboring countries, six primers and two TaqMan probes were designed. Two primers and a probe, optimal for the development of the test system, were experimentally identified. During a series of experiments, C-RT-PCR parameters such as oligonucleotide and magnesium ion concentrations, as well as annealing temperature were optimized. To control the reaction conditions in each tube, an oligonucleotide system was developed for the amplification and detection of the mammalian beta-actin gene region. The possibility of simultaneous application of two PCR systems in one test tube has been experimentally demonstrated. Analysis of 193 N-gene sequences of various rabies virus isolates showed that the developed oligonucleotides can theoretically ensure detection of the vast majority of the viruses circulating in the Russian Federation and neighboring countries.

Conclusion. The main components and reaction conditions of the test system for detecting the rabies virus genome by C-RT-PCR using mammalian beta-actin gene-based endogenous internal control have been developed and optimized.

Keywords: rabies virus, test system, real-time PCR, combined RT-PCR, one-step RT-PCR, endogenous internal control, beta-actin, rabies molecular diagnosis

Acknowledgements: The work was performed at the expense of the Federal Centre for Animal Health in the framework of scientific research on the topic "Animal Health Freedom".

For citation: Chupin S. A., Chernyshova E. V., Chufarova E. A. Development of a test system for detection of the rabies virus genome using real-time PCR with an endogenous control: Theoretical design and optimization. *Veterinary Science Today*. 2026; 15 (3): 262–272. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-262-272>

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

For correspondence: Sergei A. Chupin, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Reference Laboratory for Rabies and BSE, Federal Centre for Animal Health, ul. Gvardeyskaya, 6, Yur'evets, Vladimir 600901, Russia, chupin@arriah.ru

ВВЕДЕНИЕ

Бешенство в России, несмотря на снизившуюся в последние десять лет инцидентность [1], остается крайне актуальным заболеванием. За шесть лет (с 2020 по 2025 г.) зафиксировано в среднем в год 1180 случаев заболевания животных бешенством (минимально: 810 – в 2022 г., максимально: 1579 – в 2020 г.).

В российских ветеринарных диагностических учреждениях в рутинной диагностике бешенства первоначально используется метод флуоресцирующих антител. В случае получения отрицательных или сомнительных результатов прибегают к вспомогательным методам, таким как биопроба на чувствительных животных или в культуре клеток, иммуноферментный анализ, реакция иммунопреципитации [2, 3].

Всемирная организация здравоохранения животных (ВОЗЖ) также рекомендует полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в классическом варианте и в режиме реального времени для выявления вирусов рода *Lyssavirus*, а более узкоспецифичные варианты ПЦР – для сомнительных случаев [4]. Согласно последним данным Международного комитета по таксономии вирусов, род *Lyssavirus* включает 19 видов [5]. На территории РФ выявлялись вирусы только 4 видов: вирус классического бешенства (*Lyssavirus rabies*), лиссавирус Иркут (*Lyssavirus irkut*), лиссавирус западно-кавказских летучих мышей (*Lyssavirus caucasicus*) и лиссавирус европейских летучих мышей I типа, современное название которого – лиссавирус Гамбург (*Lyssavirus hamburg*) [6, 7, 8]. Однако подавляющее число случаев заболеваний человека и животных приходится на вирус классического бешенства (вирус бешенства).

Лиссавирусы последних трех видов в природе были обнаружены только у летучих мышей, зафиксировано менее 10 случаев поражения этими вирусами людей, имевших контакт с летучими мышами [9]. Таким образом, наиболее целесообразным представляется сфокусироваться на разработке тест-системы выявления вируса бешенства, а в тех редких случаях, где вовлечены летучие мыши, использовать соответствующие методы с родоспецифическими праймерами.

На основании филогенетического анализа изоляты вируса бешенства могут быть объединены в две крупные группы: Bat-related и Dog-related [10, 11, 12]. К группе Bat-related относятся вирусы Нового Света, циркулирующие среди летучих мышей, а также некоторых наземных хищных, таких как скунсы и еноты [13, 14, 15, 16]. К группе Dog-related относятся вирусы, циркулирующие по всему миру среди собак, а также диких хищных, таких как лисы и енотовидные собаки в Европе, лисы на Ближнем Востоке, лисы, енотовидные собаки и хорьковые барсуки в Азии, скунсы, лисы, койоты и мангусти в Америке и мангусти в Африке [13, 15, 17, 18, 19, 20, 21].

Группа Dog-related включает, в свою очередь, шесть больших клад: Africa-2, Africa-3, Arctic-related, Asian, Cosmopolitan и Indian subcontinent [11].

На территории РФ обнаруживаются вирусы бешенства, относящиеся к двумкладам: Arctic-related и Cosmopolitan. Клада Arctic-related делится на две большие генетические группы: Arctic и Arctic-like [12]. Аклада Cosmopolitan делится на множество генетических групп; на территории России выявляются представители групп C (steppe), D, E, F (Caucasion) [22, 23, 24].

Генетические группы Arctic, Arctic-like, C, в свою очередь, делятся на генетические подгруппы и более мелкие таксоны [12, 23].

Учитывая такое большое генетическое разнообразие, представляется целесообразным использовать при разработке методики изоляты клад Arctic-related и Cosmopolitan, охватывая все генетические группы и входящие в них подгруппы, которые были выявлены на территории России, а также сопредельных государств.

Актуальные нормативы предъявляют достаточно жесткие требования к качеству исследований, проводимых методом ПЦР. Применение внутренних контролей, свидетельствующих об успешном выделении нуклеиновой кислоты и наличии приемлемых условий реакций в каждой пробирке, является современным стандартом [25, 26]. Есть различные подходы к дизайну системы внутреннего контроля. Одним из наиболее привлекательных для разработки тест-системы является использование параллельной реакции амплификации и детекции какого-либо гена домашнего хозяйства из клеток исследуемого организма, которые в любом случае содержатся в тестируемом образце [27]. Такой подход позволяет сократить расходы на производство внутреннего контрольного образца (ВКО), исключает этап добавления ВКО в ходе проведения испытаний, что в конечном итоге снижает стоимость набора реагентов и сокращает время исследования.

Цель исследования – выполнение теоретического дизайна и оптимизация тест-системы на основе совмещенной обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (С-ОТ-ПЦР) для выявления фрагмента генома вируса бешенства с использованием эндогенного внутреннего контроля.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Статистические данные о заболеваемости бешенством животных за 2020–2025 гг. получены из информационно-аналитического центра ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир.

В работе использованы вакцинный штамм вируса бешенства «РВ-97» и лабораторный фиксированный штамм вируса бешенства «CVS» с инфекционной активностью 6,2 и 7,6 lg ТЦИД₅₀/мл соответственно.

Материалом для исследования послужили образцы головного мозга животных разных видов, положительные и отрицательные на вирус бешенства, поступившие для анализа в референтную лабораторию по бешенству и BSE ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир).

Выделение РНК проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-сорб» (ФБУН Центральный НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) согласно инструкции производителя.

Олигонуклеотиды синтезированы в НПК «Синтол» (Россия).

Для С-ОТ-ПЦР использованы реактивы из «Набора реагентов для проведения ПЦР, совмещенной с реакцией обратной транскрипции» производства НПК «Синтол» (кат. № ОТ-02).

Выравнивание и анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли в программе BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.2.5 [28] с помощью алгоритма CLUSTAL с параметрами по умолчанию. Подсчет нуклеотидных отличий (%) между

последовательностями производили в той же программе с использованием утилиты Sequence Identity Matrix. Дизайн олигонуклеотидов и проверку специфичности *in silico* осуществляли с помощью онлайн-сервиса Primer Blast¹.

В качестве отрицательного контрольного образца использовали деионизированную воду, свободную от нуклеаз, производства НПО «Евроген» (Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В базе данных GenBank преобладает информация о гене N изолятов вируса бешенства по сравнению с другими генами. Кроме того, ген N является наиболее консервативным среди всех генов вируса бешенства [29]. Поэтому этот ген был выбран мишенью для системы детекции генома вируса бешенства. Вирусы бешенства, циркулирующие на территории РФ, отличаются большим разнообразием. Анализ нуклеотидных последовательностей гена N изолятов вируса бешенства, информация о которых содержится в GenBank, показывает, что внутри клады Arctic-related нуклеотидные отличия между наименее родственными изолятами составляют до 9,0%. Внутри клады Cosmopolitan отличия составляют до 14,2%. Следовательно, требуется тщательный анализ последовательностей, чтобы подобрать праймеры таким образом, чтобы они подходили ко всем изолятам, для которых может потребоваться экспертиза на территории РФ, с минимальным числом несовпадений нуклеотидов. Также следовало учитывать изоляты, выявленные на территории соседних государств, ввиду возможности заноса вируса в РФ.

Исходя из вышеизложенных требований, для дизайна праймеров было получено выравнивание, содержащее, после исключения идентичных и почти идентичных, последовательности полноразмерного гена N (1353 н. о.) 190 изолятов вируса бешенства, а именно:

- 85 изолятов группы C (разные подгруппы);
- 33 изолята группы D;
- 6 изолятов группы E (NEE), включая 3 изолята из Эстонии;
- 7 изолятов группы F, включая 4 изолята из Грузии и по одному изоляту из Турции и Ирана;
- 33 изолята группы Arctic;
- 10 изолятов группы Arctic-like;
- 12 изолятов из стран Европы и Азии, представляющих группы EE, WE, CE, CA4;
- 4 изолята клады Asian, выявленные в Китае.

Кроме того, были учтены последовательности гена N трех вакцинных штаммов вируса бешенства, используемых в России. Характеристика изолятов, использованных при дизайне праймеров, представлена в таблице 1, размещенной в разделе *Дополнительные файлы* по адресу <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-262-272>.

Подбор олигонуклеотидов проводили в соответствии с принципами, изложенными в работе S. Bustin and J. Huggett [30]. Поиск консервативных участков гена N осуществляли на выравнивании изолятов вируса бешенства в программе BioEdit и подбирали к ним олигонуклеотиды с помощью онлайн-сервиса Primer-Blast. В результате было получено 6 праймеров (3 прямых и 3 обратных) и 2 TaqMan-зонда (табл. 2).

¹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>

Таблица 2
Первичная структура праймеров и зондов для разработки тест-системы для выявления генома вируса бешенства методом ПЦР в режиме реального времени

Table 2
Primary structure of primers and probes for the development of the test system for rabies virus RNA detection by real-time PCR

№	Наименование	Первичная структура (5'...3')	Положение в гене N	Ориентация
1	RRTF492_SC	CATTGCAGATAGGATAGAGCA	492–512	прямой
2	RRTR645_SC	GGAGAAAAACATGTCGTAGGT	625–645	обратный
3	RRTF796A_SC	GAGGAAGAGATAAGAAGRATGT	796–817	прямой
4	RRTF914_SC	TTGGTCATGTGTTAATCTCAT	914–935	прямой
5	RRTR1093_SC	CTTCTCATCTCTGAAGAATCT	1072–1093	обратный
6	RRTR1102_SC	CTGAAGTTCTTCTCATCTCT	1081–1102	обратный
7	Probe-RRTF577_SC	FAM-ATGTGTGCTAATTGGAGTACTATAC-RTQ1	577–601	прямой
8	Probe-RRTR1016_SC	FAM-GCATGTGCTCCTCATGAGATGTC-RTQ1	1016–1038	прямой

Данные олигонуклеотиды теоретически могут сочетаться в системе ПЦР в пяти различных комбинациях (табл. 3). Эти комбинации были проверены *in silico* на специфичность относительно нуклеотидных последовательностей, представленных в GenBank, при этом потенциальных неспецифических совпадений с гетерологичными последовательностями выявлено не было.

Разработанные олигонуклеотиды были синтезированы, и каждая комбинация опробована в ПЦР на примере штаммов вируса бешенства «PB-97» и «CVS». При этом была использована программа температурно-временных режимов, рекомендованная инструкцией к «Набору реагентов для проведения ПЦР, совмещенной с реакцией обратной транскрипции». По результатам эксперимента лучшей комбинацией олигонуклеотидов, при использовании которой значение *Ct* было наименьшим (23,3 для «CVS» и 27,6 для «PB-97»), была RRTF492_SC, RRTR645_SC, Probe-RRTF577_SC, в то время как при использовании других комбинаций значение *Ct* было выше (24,1–25,6 для «CVS» и 27,8–28,9 для «PB-97»). Поэтому комбинация № 1 была выбрана для дальнейшей работы. Пример графика накопления флуоресцентного сигнала показан на рисунке 1. Соответствие олигонуклеотидов из комбинации № 1 нуклеотидным последовательностям различных изолятов вируса бешенства представлено на рисунке 2.

В ходе серии экспериментов были оптимизированы такие параметры С-ОТ-ПЦР, как концентрация олигонуклеотидов, концентрация ионов магния и температура отжига. Оптимизация проводилась с использованием двух штаммов вируса бешенства – «PB-97» и «CVS» – в качестве положительных контролей. Оптимальные концентрации олигонуклеотидов составили 0,4 мкМ для праймеров и 0,8 мкМ для зонда. Оптимальная концентрация ионов магния – 4 мМ. Оптимальная температура отжига – 56 °С. В конечном итоге программа для ОТ-ПЦР получила вид:

- 1) 45 °С – 20 мин;
- 2) 95 °С – 5 мин;
- 3) 37 циклов:
 - а) 95 °С – 15 с;
 - б) 56 °С – 15 с;
 - в) 72 °С – 15 с.

Таблица 3
Комбинации праймеров и зондов для разработки тест-системы для выявления генома вируса бешенства методом ПЦР в режиме реального времени

Table 3
Combinations of primers and probes for the development of the test system for rabies virus RNA detection by real-time PCR

№	Олигонуклеотиды	Размер ампликона
1	RRTF492_SC, RRTR645_SC, Probe-RRTF577_SC	154
2	RRTF796A_SC, RRTR1093_SC, Probe-RRTR1016_SC	297
3	RRTF796A_SC, RRTR1102_SC, Probe-RRTF1016_SC	306
4	RRTF914_SC, RRTR1093_SC, Probe-RRTF1016_SC	179
5	RRTF914_SC, RRTR1102_SC, Probe-RRTF1016_SC	188

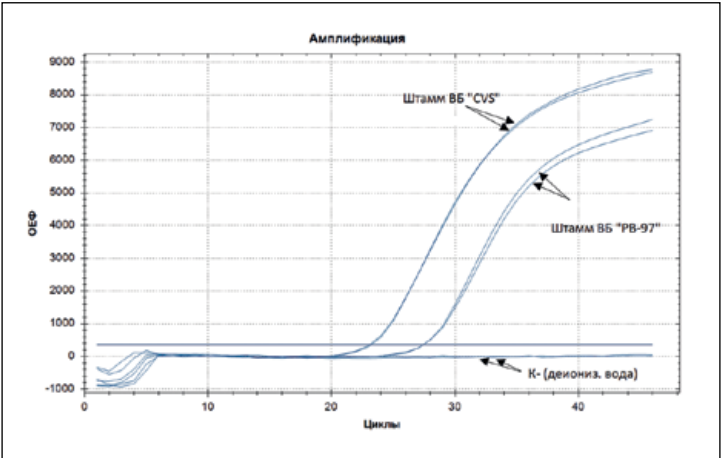


Рис. 1. График накопления флуоресцентного сигнала по каналу FAM в С-ОТ-ПЦР с олигонуклеотидами RRTF492_SC, RRTR645_SC и Probe-RRTF577_SC на примере штаммов вируса бешенства и отрицательного контроля (n = 2)

Fig. 1. Fluorescence signal accumulation curve for FAM channel in C-RT-PCR with oligonucleotides RRTF492_SC, RRTR645_SC, and Probe-RRTF577_SC by the example of rabies virus strains and a negative control (n = 2)

Флуоресцентный сигнал считывается по каналу FAM на шаге 3(б).

Для проведения контроля условий реакции в каждой пробирке был выбран подход с применением так

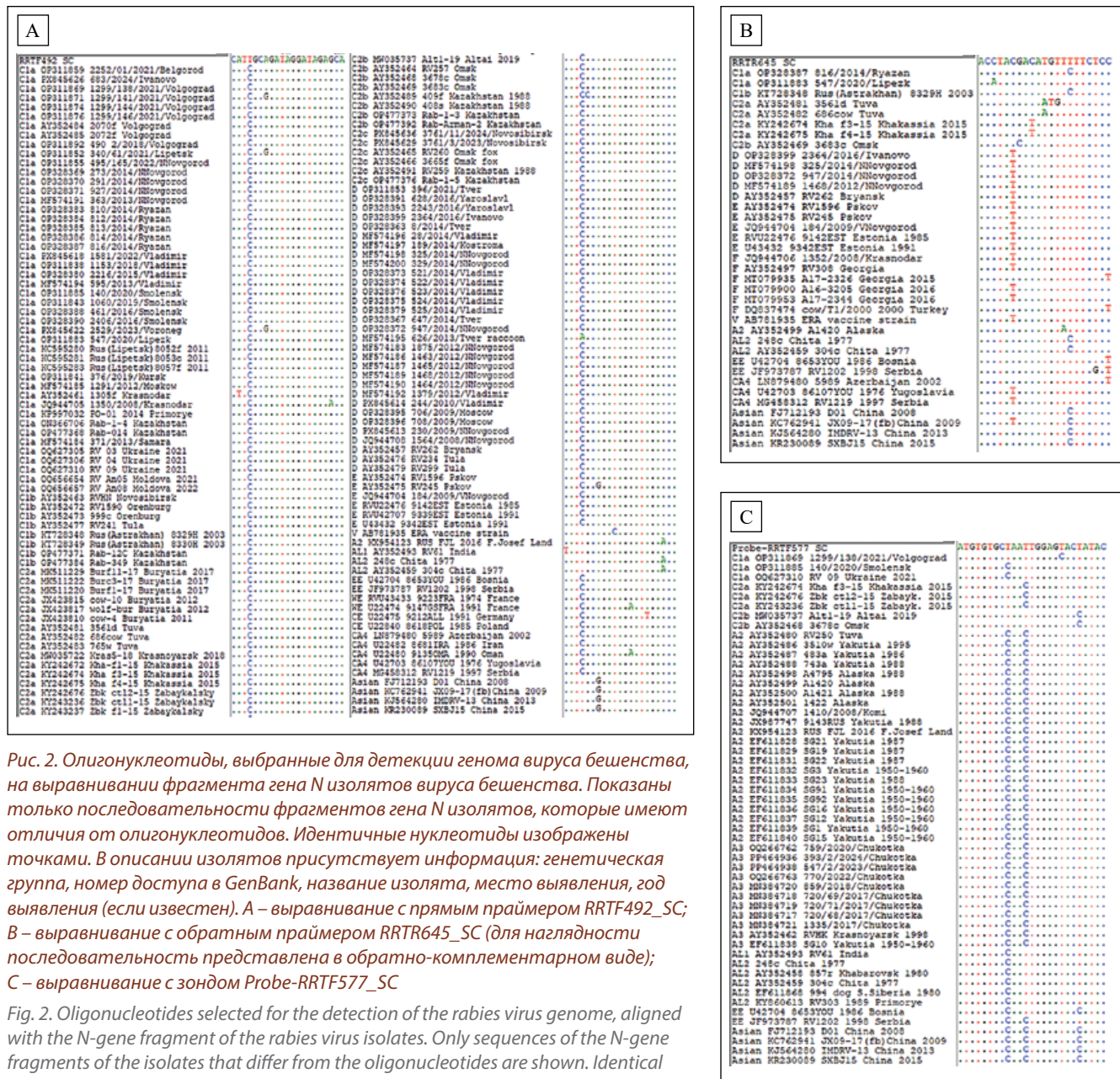


Рис. 2. Олигонуклеотиды, выбранные для детекции генома вируса бешенства, на выравнивании фрагмента гена N изолятов вируса бешенства. Показаны только последовательности фрагментов гена N изолятов, которые имеют отличия от олигонуклеотидов. Идентичные нуклеотиды изображены точками. В описании изолятов присутствует информация: генетическая группа, номер доступа в GenBank, название изолята, место выявления, год выявления (если известен). А – выравнивание с прямым праймером RRTF492_SC; В – выравнивание с обратным праймером RRTR645_SC (для наглядности последовательность представлена в обратном-комплементарном виде); С – выравнивание с зондом Probe-RRTF577_SC

Fig. 2. Oligonucleotides selected for the detection of the rabies virus genome, aligned with the N-gene fragment of the rabies virus isolates. Only sequences of the N-gene fragments of the isolates that differ from the oligonucleotides are shown. Identical nucleotides are featured as dots. The isolate description line includes the following information: genetic group, GenBank accession number, isolate name, site of detection, and year of detection (if known). A – alignment with the forward primer RRTF492_SC; B – alignment with the reverse primer RRTR645_SC (for clarity, the sequence is shown in reverse-complement format); C – alignment with Probe-RRTF577_SC

Таблица 4

Первичная структура праймеров и зондов для разработки тест-системы для выявления генома вируса бешенства методом ПЦР в режиме реального времени

Table 4

Primary structure of primers and probes for the development of the test system for rabies virus RNA detection by real-time PCR

№	Наименование	Первичная структура (5'...3')	Положение в гене бета-актина*	Ориентация
1	ICFHD_SC	SATGAAGATCAAGATCATYGC	1056–1076	прямой
2	ICR_SC	TTTGGCGTGSACGATGGAG	1186–1204	обратный
3	Probe-IC_SC	Cy5-CCAGCAGATGTGGATCAGCAAG-RTQ2	1140–1161	прямой

* нумерация приведена по последовательности гена бета-актина человека NM_001101 (numbering is given according to human beta-actin gene sequence NM_001101).



Рис. 3. Олигонуклеотиды для системы эндогенного контроля на выравнивании фрагмента гена актина различных видов млекопитающих. Идентичные нуклеотиды изображены точками. В заголовке последовательностей присутствует информация: номер доступа в GenBank, биномиальное название вида животного / отряд / семейство. А – выравнивание с прямым праймером ICFHD_SC; В – выравнивание с обратным праймером ICR_SC (для наглядности последовательность представлена в обратном-комплементарном виде); С – выравнивание с зондом Probe-IC_SC

Fig. 3. Oligonucleotides for the endogenous control system aligned with the actin gene fragment of various mammalian species. Identical nucleotides are featured as dots. The sequence description lines include the following information: GenBank accession number, binomial species name / order / family. A – alignment with the forward primer ICFHD_SC; B – alignment with the reverse primer ICR_SC (for clarity, the sequence is shown in reverse-complement format); C – alignment with Probe-IC_SC

Специфичность дизайна праймеров была проверена с помощью интернет-сервиса Primer-BLAST. Проверка показала, что данная система в ряде случаев нацелена также на другие подвиды актина (альфа-актин, гамма-актин) и другие виды животных, включая беспозвоночных, что можно объяснить, по всей видимости, тем, что данные разновидности гена актина являются паралогами [37]. Последовательность зондов в этих случаях также совпадала с соответствующими участками генома. Подобная неспецифичность в данном случае не искажает результатов исследования, поскольку цель системы – подтвердить наличие

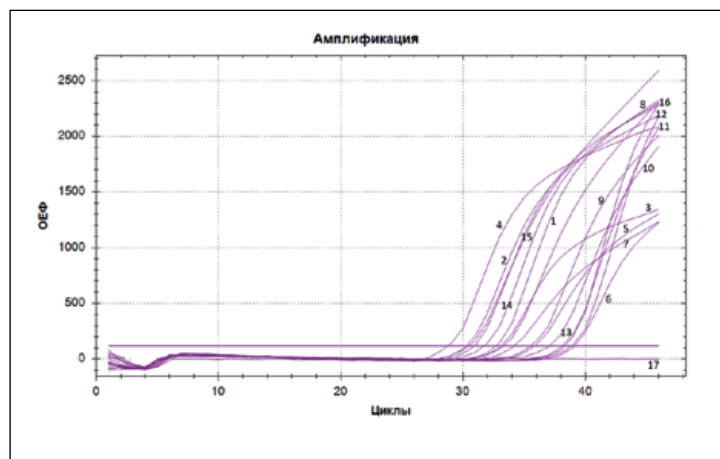


Рис. 4. График накопления флуоресцентного сигнала по каналу Cy-5 в С-ОТ-ПЦР с олигонуклеотидами ICFHD_SC, ICR_SC и Probe-IC_SC на примере образцов головного мозга от млекопитающих разных видов. Цифрами на графике обозначены виды животных: 1 – лисица, 2 – собака, 3 – кошка, 4 – енотовидная собака, 5 – КРС, 6 – волк, 7 – барсук, 8 – хорек, 9 – куница, 10 – норка, 11 – мышь, 12 – белка, 13 – медведь, 14 – верблюд, 15 – лось, 16 – коза, 17 – отрицательный контроль (деионизированная вода)

Fig. 4. Fluorescence signal accumulation curve for Cy-5 channel in C-RT-PCR with oligonucleotides ICFHD_SC, ICR_SC, and Probe-IC_SC using brain samples from mammals of various species. The numbers on the curve indicate the animal species: 1 – fox, 2 – dog, 3 – cat, 4 – raccoon dog, 5 – cattle, 6 – wolf, 7 – badger, 8 – ferret, 9 – marten, 10 – mink, 11 – mouse, 12 – squirrel, 13 – bear, 14 – camel, 15 – elk, 16 – goat, 17 – negative control (deionised water)

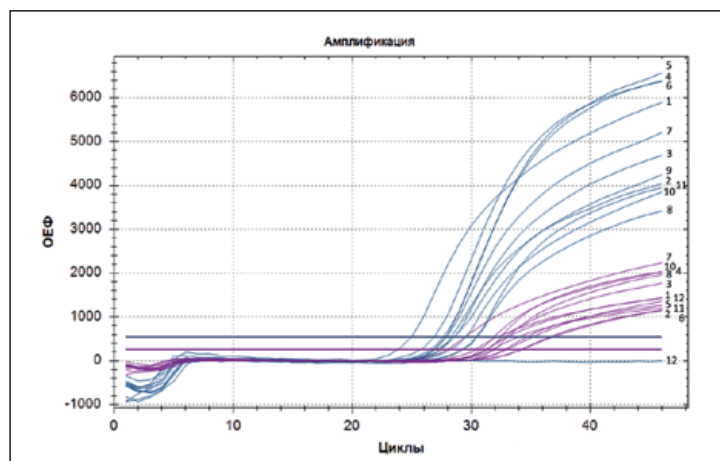


Рис. 5. График накопления флуоресцентного сигнала по каналам FAM (синий цвет) и Cy-5 (фиолетовый цвет) в С-ОТ-ПЦР с олигонуклеотидами RRTF492_SC, RRTR645_SC, Probe-RRTF577_SC, ICFHD_SC, ICR_SC, Probe-IC_SC на примере образцов головного мозга, положительных на вирус бешенства. Цифрами на графике обозначены: 1–11 – положительные образцы, 12 – отрицательный контроль (образец головного мозга, не содержащий вируса бешенства)

Fig. 5. Fluorescence signal accumulation curve for FAM (blue) and Cy-5 (purple) channels in C-RT-PCR with oligonucleotides RRTF492_SC, RRTR645_SC, Probe-RRTF577_SC, ICFHD_SC, ICR_SC, and Probe-IC_SC using rabies virus positive-brain samples. The numbers on the curve indicate the samples: 1–11 – positive samples, 12 – negative control (brain sample free from the rabies virus)

надлежащих условий для проведения С-ОТ-ПЦР. Наоборот, такая универсальность позволяет предположить, что выбранные участки действительно высококонсервативны и система будет работать даже с материалом от животных, геном которых не рассматривали в процессе дизайна олигонуклеотидов.

Соответствие олигонуклеотидов для системы ЭК нуклеотидным последовательностям генов актина различных млекопитающих представлено на рисунке 3.

Работоспособность данной системы была проверена на примере образцов головного мозга лисицы, крупного рогатого скота (КРС) и собаки с применением той же программы температурно-временных режимов, что и для вируса бешенства. Для обеспечения проверки этапа обратной транскрипции образцы РНК были обработаны ДНКазой. Была оптимизирована концентрация олигонуклеотидов.

Оптимальными концентрациями были 8 мкМ для праймеров и зондов, однако с учетом того, что целевая реакция должна иметь преимущество, решено было в дальнейшем использовать праймеры в концентрации 4 мкМ и зонд в концентрации 8 мкМ. Оптимизация других параметров не проводилась, поскольку оптимальные условия уже были найдены для более приоритетной целевой реакции.

Была проведена проверка разработанной системы ЭК на примере образцов головного мозга 16 различных видов млекопитающих, которые поступают в лабораторию для анализа на бешенство (лисица, собака, кошка, енотовидная собака, КРС, волк, барсук, хорек, куница, норка, мышь, белка, медведь, верблюд, лось, коза), положительных или отрицательных на вирус бешенства. Во всех случаях был получен флуоресцентный сигнал по каналу для ЭК, свидетельствующий о прохождении реакции (рис. 4). Таким образом, была подтверждена надежность разработанной системы в отношении видов животных, которые не учитывались (ввиду отсутствия данных) при дизайне олигонуклеотидов.

На следующем этапе была испытана совместимость разработанной системы ЭК с системой для детекции вируса бешенства (рис. 5). Было показано, что использование ЭК не снижает чувствительность целевой реакции.

ОБСУЖДЕНИЕ

На данный момент накоплен достаточно большой объем данных по характеристике геномов изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории РФ. При этом большая их часть получена в последние десять лет [23, 24, 38, 39, 40, 41]. Поэтому методы выявления вируса бешенства в полевом материале требуют учета этой информации. Между тем на данный момент единственной работой, в деталях описывающей разработку тест-системы для выявления вируса бешенства на основе ПЦР в режиме реального времени, выполненной с учетом генетических особенностей российских изолятов, является статья В. Г. Дедкова и соавт. [42], опубликованная в 2016 г. Очевидно, что разработка тест-системы, отвечающей современным данным, является актуальной задачей.

Олигонуклеотиды из комбинации, выбранной опытным путем для дизайна тест-системы, имеют достаточное соответствие участкам генома изолятов вируса бешенства, выявленных на территории РФ и прилегающих государств. Действительно, как видно из рисунка 2А, праймер RRTF492_SC подходит по всем позициям

к 51 изоляту (не представлены на рисунке). Он имеет одно так называемое мягкое несовпадение G-T [43] ближе к 5'-концу с 123 изолятами из разных стран, по одному несовпадению ближе к 5'-концу с изолятами клады Asian из Китая, одно несовпадение в середине праймера с вакцинным штаммом ERA, одно несовпадение на 5'-конце с индийским штаммом линии AL2, по два несовпадения в 5'-половине с 5 изолятами из России и одним из Казахстана. Наиболее критичны случаи со штаммом из Казахстана (два несовпадения подряд ближе к 5'-концу), с 3 изолятами из Франции, Германии и Омана из филогенетических групп, не встречающихся на территории России (имеют по два несовпадения, одно из которых в 3'-половине праймера); 4 изолята генетических линий A2, AL2 и C1a имеют «мягкое» несовпадение в третьей позиции от 3'-конца.

Как видно из рисунка 2B, праймер RRTR645_SC подходит по всем позициям к 156 изолятам (не представлены на рисунке). 21 изолят имеет по одному несовпадению от этого праймера в 5'-половине; 9 изолятов имеют единичные несовпадения в 3'-половине, но ближе к середине праймера – все «мягкие»; 1 изолят из Китая имеет два несовпадения в середине, одно из которых «мягкое»; изоляты из Грузии, Турции, Боснии и Азербайджана имеют по одному «мягкому» несовпадению на 3'-конце; изолят из Сербии имеет два несовпадения через один нуклеотид на 3'-конце, одно из которых «мягкое»; наибольшее число несовпадений у 1 изолята из Тувы: три несовпадения подряд в середине праймера.

Как видно из рисунка 2C, зонд Probe-RRTF577_SC подходит по всем позициям к 139 изолятам (не представлены на рисунке). 12 изолятов имеют по одному несовпадению приблизительно в середине зонда; 2 изолята имеют по одному несовпадению в пятой позиции от 3'-конца зонда; 34 изолята, относящиеся к генетической группе Arctic, и 1 изолят из Сербии имеют по два «мягких» несовпадения в середине зонда; 1 изолят из Боснии имеет два «мягких» несовпадения, одно из которых находится в пятой позиции от 3'-конца зонда; наибольшее число отличий (три несовпадения, все «мягкие») присутствует у изолятов из Китая клады Asian.

Таким образом, сравнение последовательностей олигонуклеотидов, разработанных для детекции вируса бешенства, и геномов изолятов вируса бешенства, выявленных в РФ или имеющих потенциал быть занесенными на территорию РФ, показало, что данные олигонуклеотиды в большинстве случаев подходят полностью, в ряде случаев имеют незначительные или «мягкие» несовпадения, в очень небольшом числе случаев вызывают сомнения, как, например, с изолятами из Китая и одним изолятом из Тувы. Стоит отметить, что изоляты клады Asian до сих пор еще не были обнаружены на территории России и были включены в анализ только потому, что Китай граничит с Россией и занос потенциально возможен, а изолят из Тувы, с тремя несовпадениями нуклеотидов подряд, представляет собой исключение, по-видимому, редкую мутацию, которая отсутствует у всех других изолятов, в том числе выявленных на территории Республики Тува. Таким образом, теоретический дизайн рассмотренных олигонуклеотидов представляется удовлетворительным для разработки тест-системы. Влияние конкретных выявленных несовпадений на эффективность амплификации экспериментально не оценивалось в рамках

настоящей работы и является одним из ограничений исследования.

При дизайне тест-системы нами был применен метод С-ОТ-ПЦР (также известный как combined RT-PCR, одношаговая ОТ-ПЦР, one-step RT-PCR), при котором в одну пробирку с реакционной смесью сразу добавляют обратную транскриптазу и Taq-полимеразу, реакции обратной транскрипции и ПЦР проводят последовательно друг за другом в одной пробирке. Такой подход снижает риск кросс-контаминации, уменьшает время выполнения анализа и снижает себестоимость компонентов набора [44, 45].

В ранее проводимых исследованиях, где использовался подход с применением эндогенного контроля на основе гена бета-актина млекопитающих при разработке ПЦР-методик для выявления лиссавирусов, количество видов животных, геном которых при этом учитывался, было ограничено. Так, в работе С. М. Freuling et al. [31] были использованы только геномы КРС и овцы, а в других работах [33, 34] хотя и был использован больший спектр видов животных (овца, летучая мышь, КРС, морская свинка, лошадь, человек, мышь и крыса), но все же, с учетом разнообразия млекопитающих, недостаточный.

Как видно из рисунка 3, олигонуклеотиды, разработанные для детекции фрагмента гена актина млекопитающих, почти полностью соответствуют целевым последовательностям. Так, прямой праймер ICFHD_SC имеет одно несовпадение в середине с геномом летучей мыши большой подковонос; обратный праймер ICR_SC имеет одно несовпадение в середине с геномом собаки и по одному несовпадению в предпоследней позиции с геномами домового мыши и девятипоясного броненосца; зонд Probe-IC_SC имеет по одному «мягкому» несовпадению в крайней 3'-позиции (наименее критичной для TaqMan-зондов) для геномов четырех видов млекопитающих и одно несовпадение в крайней 5'-позиции для генома китайского ящера. Во всех остальных случаях совпадение полное.

Как было показано в серии экспериментов (см., например, рис. 5), в целом сигнал на ЭК срабатывает позже, чем на вирус бешенства, при тестировании типичных для анализа полевых образцов. Следовательно, целевая реакция имеет конкурентное преимущество перед контрольной, что важно для обеспечения надлежащей чувствительности анализа.

Таким образом, при проведении экспертизы патологического материала на наличие вируса бешенства с использованием ЭК в каждой пробирке будет нарабатываться фрагмент гена актина млекопитающих, о чем будет свидетельствовать соответствующий флуоресцентный сигнал. Наличие данного сигнала должно подтверждать соблюдение необходимых условий анализа: надлежащее выделение РНК, отсутствие ингибиторов обратной транскрипции и ПЦР, удовлетворительное качество химических реактивов, олигонуклеотидов и ферментов для обратной транскрипции и ПЦР, приемлемые температурно-временные режимы. Отсутствие сигнала свидетельствует о нарушении одного или нескольких из этих условий, за исключением возможных случаев, когда сигнал для ЭК отсутствует, но присутствует сигнал для вируса бешенства (положительный результат на вирус бешенства), тогда результаты в данной пробирке считаются валидными, так как целевая реакция имеет конкурентное преимущество

перед контрольной и может подавлять последнюю. При отсутствии же сигналов как по целевой реакции, так и по ЭК результат считается невалидным и образец подлежит повторному исследованию.

Для дополнительного обеспечения качества анализа в тест-системе будут также использованы внешние контрольные образцы: положительный контрольный образец, представляющий собой культуральную суспензию инактивированного штамма вируса бешенства «РВ-97», и отрицательный контрольный образец, представляющий собой деионизированную воду, свободную от нуклеаз. Данные образцы вносятся в отдельные пробирки на этапе выделения РНК и проходят те же этапы анализа, что и тестируемые образцы.

В ходе следующего этапа разработки данной тест-системы будут изучены аспекты валидации, а именно предел обнаружения, чувствительность, специфичность, воспроизводимость, повторяемость, правильность, эффективность ПЦР, оценка неопределенности измерения. Также будет проведена апробация тест-системы с полевыми образцами патологического материала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны и оптимизированы основные компоненты и условия реакции тест-системы для выявления генома вируса бешенства методом С-ОТ-ПЦР с использованием ЭК на основе гена бета-актина млекопитающих. Показано, что использование ЭК позволяет контролировать условия проведения всех этапов исследования в каждой пробирке при использовании биоматериала от млекопитающих.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гулюкин А. М., Шабейкин А. А. Обзор современной эпизоотической ситуации по бешенству в Российской Федерации. Динамика изменений за 35-летний период, закономерности, влияющие факторы. *Ветеринария сегодня*. 2025; 14 (3): 232–240. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2025-14-3-232-240>
- ГОСТ 26075-2013 Животные. Методы лабораторной диагностики бешенства. <https://docs.cntd.ru/document/1200104625>
- Хисматуллина Н. А., Юсупов Р. Х., Чернов А. Н., Янбарисова С. Р., Тятигачев Ш. А., Селимов М. А. и др. Методические указания по лабораторной диагностике бешенства животных: утв. Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода России 14.05.1997. 11 с.
- Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses). In: *WOAH. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2023; Chapter 3.1.18. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.18_RABIES.pdf
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). MSL41: 2025–2026 ICTV taxonomy release. International 2026. <https://ictv.global/msl>
- Полещук Е. М., Кузьмин И. В., Газарян С. В., Ботвинкин А. Д. Западно-кавказский лиссавирус рукокрылых: отсутствие вакцинной защиты. *Plecotus et al.* 2003; (6): 67–71.
- Botvinkin A. D., Poleschuk E. M., Kuzmin I. V., Borisova T. I., Gazaryan S. V., Yager P., Rupprecht C. E. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. *Emerging Infectious Diseases*. 2003; 9 (12): 1623–1625. <https://doi.org/10.3201/eid0912.030374>
- Leonova G. N., Somova L. M., Belikov S. I., Kondratov I. G., Plekhova N. G., Krylova N. V., et al. The fatal case of lyssavirus encephalitis in the Russian Far East. In: *Encephalitis*. Ed. by S. E. Tkachev. Croatia: InTechOpen; 2013; Chapter 13: 231–250. <https://doi.org/10.5772/52869>
- Полещук Е. М., Тагакова Д. Н., Сидоров Г. Н., Орлова Т. С., Гордейко Н. С., Кайсаров А. Ж. Случаи летальной лиссавирусной инфекции у людей после контактов с рукокрылыми на Дальнем Востоке России в 2019–2021 гг. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68 (1): 45–58. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-156>
- Badrane H., Tordo N. Host switching in *Lyssavirus* history from the Chiroptera to the Carnivora orders. *Journal of Virology*. 2001; 75 (17): 8096–8104. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.17.8096-8104.2001>
- Bourhy H., Reynes J.-M., Dunham E. J., Dacheux L., Larrous F., Huang V. T., et al. The origin and phylogeography of dog rabies virus. *Journal of General Virology*. 2008; 89 (11): 2673–2681. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/003913-0>
- Kuzmin I. V., Hughes G. J., Botvinkin A. D., Gribencha S. G., Rupprecht C. E. Arctic and Arctic-like rabies viruses: distribution, phylogeny and evolutionary history. *Epidemiology and Infection*. 2008; 136 (4): 509–519. <https://doi.org/10.1017/S095026880700903x>
- Kuzmin I. V., Shi M., Orciari L. A., Yager P. A., Velasco-Villa A., Kuzmina N. A., et al. Molecular inferences suggest multiple host shifts of rabies viruses from bats to mesocarnivores in Arizona during 2001–2009. *PLoS Pathogens*. 2012; 8 (6): e1002786. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002786>
- Biek R., Henderson J. C., Waller L. A., Rupprecht C. E., Real L. A. A high-resolution genetic signature of demographic and spatial expansion in epizootic rabies virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007; 104 (19): 7993–7998. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700741104>
- Davis R., Nadin-Davis S. A., Moore M., Hanlon C. Genetic characterization and phylogenetic analysis of skunk-associated rabies viruses in North America with special emphasis on the central plains. *Virus Research*. 2013; 174 (1–2): 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.02.008>
- Kuzmina N. A., Lemey P., Kuzmin I. V., Mayes B. C., Ellison J. A., Orciari L. A., et al. The phylogeography and spatiotemporal spread of south-central skunk rabies virus. *PLoS ONE*. 2013; 8 (12): e82348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082348>
- Bourhy H., Kissi B., Audry L., Smreczak M., Sadkowska-Todys M., Kulonen K., et al. Ecology and evolution of rabies virus in Europe. *Journal of General Virology*. 1999; 80 (10): 2545–2557. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-10-2545>
- Nel L. H., Sabeta C. T., von Teichman B., Jaftha J. B., Rupprecht C. E., Bingham J. Mongoose rabies in southern Africa: a re-evaluation based on molecular epidemiology. *Virus Research*. 2005; 109 (2): 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.12.003>
- Oem J.-K., Kim S.-H., Kim Y.-H., Lee M.-H., Lee K.-K. Complete genome sequences of three rabies viruses isolated from rabid raccoon dogs and a cow in Korea. *Virus Genes*. 2013; 47 (3): 563–568. <https://doi.org/10.1007/s11262-013-0923-1>
- Tsai K. J., Hsu W. C., Chuang W. C., Chang J. C., Tu Y. C., Tsai H. J., et al. Emergence of a sylvatic enzootic formosan ferret badger-associated rabies in Taiwan and the geographical separation of two phylogenetic groups of rabies viruses. *Veterinary Microbiology*. 2016; 182: 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.10.030>
- Zhao J., Liu Y., Zhang S., Zhang F., Wang Y., Mi L., et al. Molecular characterization of three ferret badger (*Melogale moschata*) rabies virus isolates from Jiangxi province, China. *Archives of Virology*. 2014; 159 (8): 2059–2067. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2044-0>
- Kuzmin I. V., Botvinkin A. D., McElhinney L. M., Smith J. S., Orciari L. A., Hughes G. J., et al. Molecular epidemiology of terrestrial rabies in the former Soviet Union. *Journal of Wildlife Diseases*. 2004; 40 (4): 617–631. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.4.617>
- Deviatkin A. A., Lukashov A. N., Poleshchuk E. M., Dedkov V. G., Tkachev S. E., Sidorov G. N., et al. The phylogenetics of the rabies virus in the Russian Federation. *PLoS ONE*. 2017; 12 (2): e0171855. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171855>
- Chupin S. A., Sprygin A. V., Zinyakov N. G., Guseva N. A., Shcherbinin S. V., Korennoy F. I., et al. Phylogenetic characterization of rabies virus field isolates collected from animals in European Russian Regions in 2009–2022. *Microorganisms*. 2023; 11 (10): 2526. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102526>
- Bustin S. A., Ruijter J. M., van den Hoff M. J. B., Kubista M., Pfaffl M. W., Shipley G. L., et al. MIQE 2.0: Revision of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments Guidelines. *Clinical Chemistry*. 2025; 71 (6): 634–651. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaf043>
- Validation of diagnostic assays for infectious diseases of terrestrial animals. In: *WOAH. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2023; Chapter 1.1.6. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.06_VALIDATION.pdf
- Mittelberger C., Obkircher L., Oberkofler V., Ianeselli A., Kerschbamer C., Gallmetzer A., et al. Development of a universal endogenous qPCR control for eukaryotic DNA samples. *Plant Methods*. 2020; 16:53. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00597-2>
- Hall T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999; 41: 95–98.
- Troupin C., Dacheux L., Tanguy M., Sabeta C., Blanc H., Bouchier C., et al. Large-scale phylogenomic analysis reveals the complex evolutionary history of rabies virus in multiple carnivore hosts. *PLoS Pathogens*. 2016; 12 (12): e1006041. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006041>
- Bustin S., Huggett J. qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*. 2017; 14: 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>
- Freuling C. M., Hoffmann B., Fischer M., McElhinney L. M., Marston D. A., Fooks A. R., Müller T. F. Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction for the Demonstration of Lyssavirus Nucleic Acid. In: *Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research, and Prevention*. Ed. by C. Rupprecht, T. Nagarajan. San Diego: Academic Press; 2014; Chapter 7: 75–84. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800014-4.00007-X>
- Toussaint J. F., Sailleau C., Breard E., Zientara S., De Clercq K. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *Journal of Virological Methods*. 2007; 140 (1–2): 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.007>
- Fischer M., Wernike K., Freuling C. M., Müller T., Aylan O., Brochier B., et al. A step forward in molecular diagnostics of lyssaviruses – results of a ring trial among European laboratories. *PLoS ONE*. 2013; 8 (3): e58372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058372>

34. Wakeley P. R., Johnson N., McElhinney L. M., Marston D., Sawyer J., Fooks A. R. Development of a real-time, TaqMan reverse transcription-PCR assay for detection and differentiation of lyssavirus genotypes 1, 5, and 6. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43 (6): 2786–2792. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.6.2786-2792.2005>

35. Stuchin M., Machalaba C. M., Olival K. J., Artois M., Bengis R. G., Caceres-Soto P., et al. Rabies as a threat to wildlife. *Revue Scientifique et Technique*. 2018; 37 (2): 341–357. <https://doi.org/10.20506/rst.37.2.2858>

36. Nakajima-Iijima S., Hamada H., Reddy P., Kakunaga T. Molecular structure of the human cytoplasmic beta-actin gene: interspecies homology of sequences in the introns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985; 82 (18): 6133–6137. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.18.6133>

37. Vedula P., Kurosaka S., Leu N. A., Wolf Y. I., Shabalina S. A., Wang J., et al. Diverse functions of homologous actin isoforms are defined by their nucleotide, rather than their amino acid sequence. *eLife*. 2017; 6:e31661. <https://doi.org/10.7554/eLife.31661>

38. Chupin S. A., Botvinkin A. D., Zarva I. D., Chernyshova E. V. Phylogenetic analysis and the spatial spread of arctic rabies virus in Chukotka. *Acta Biologica Sibirica*. 2024; 10: 1805–1817. <https://doi.org/10.5281/zenodo.14555704>

39. Чупин С. А., Чернышова Е. В., Чернышев Р. С., Груздев К. Н., Спиридонов А. Н., Варкентин А. В. и др. Филогенетический анализ изолятов вируса бешенства, выделенных от животных на территории Волгоградской области. *Ветеринария сегодня*. 2025; 14 (3): 241–248. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2025-14-3-241-248>

40. Ботвинкин А. Д., Зарва И. Д., Мельцов И. В., Чупин С. А., Полещук Е. М., Зиняков Н. Г. и др. Возвращение бешенства после многолетнего межэпизоотического периода (Амурская область, Россия). *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (4): 309–318. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-4-309-318>

41. Yakovchits N. V., Adelshin R. V., Zarva I. D., Chupin S. A., Melnikova O. V., Andaeiev E. I., et al. Fox rabies outbreaks in the republic of Buryatia: Connections with neighbouring areas of Russia, Mongolia and China. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2021; 68 (2): 427–434. <https://doi.org/10.1111/tbed.13692>

42. Дедков В. Г., Десяткин А. А., Полещук Е. М., Сафонова М. В., Маркелов М. Л., Шипулин Г. А. Разработка и апробация набора реагентов для определения РНК классического вируса бешенства методом ОТ-ПЦР в реальном времени. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61 (5): 235–240. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-4-235-240>

43. Allawi H. T., Santa Lucia J. Jr. Thermodynamics and NMR of internal G-T mismatches in DNA. *Biochemistry*. 1997; 36 (34): 10581–10594. <https://doi.org/10.1021/bi962590c>

44. Kubista M., Andrade J. M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006; 27 (2–3): 95–125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>

45. de Almeida Campos A. C., Melo F. L., Romano C. M., Araujo D. B., Cunha E. M. S., Sacramento D. A. V., et al. One-step protocol for amplification of near full-length cDNA of the rabies virus genome. *Journal of Virological Methods*. 2011; 174 (1–2): 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.03.030>

REFERENCES

1. Gulyukin A. M., Shabeikin A. A. Rabies in the Russian Federation: A 35-year review of trends, patterns, and influencing factors. *Veterinary Science Today*. 2025; 14 (3): 232–240. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2025-14-3-232-240>

2. GOST 26075-2013 Animals. Methods of Laboratory Diagnostic of Rabies. <https://docs.cntd.ru/document/1200104625> (in Russ.)

3. Khismatullina N. A., Yusupov R. Kh., Chernov A. N., Yanbarisova S. R., Tyatigachev Sh. A., Selimov M. A., et al. Methodical guidance for animal rabies laboratory diagnosis: approved by the Veterinary Department of the Ministry of Agriculture and Food of Russia on 14.05.1997. 11 p. (in Russ.)

4. Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses). In: *WOAH. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2023; Chapter 3.1.18. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.18_RABIES.pdf

5. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). MSL41: 2025–2026 ICTV taxonomy release. International 2026. <https://ictv.global/msl>

6. Poleshchuk E. M., Kuzmin I. V., Gazaryan S. V., Botvinkin A. D. West Caucasian lyssavirus of bats: lack of vaccine protection. *Plecotus et al*. 2003; (6): 67–71. (in Russ.)

7. Botvinkin A. D., Poleshchuk E. M., Kuzmin I. V., Borisova T. I., Gazaryan S. V., Yager P., Rupprecht C. E. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. *Emerging Infectious Diseases*. 2003; 9 (12): 1623–1625. <https://doi.org/10.3201/eid912.030374>

8. Leonova G. N., Somova L. M., Belikov S. I., Kondratov I. G., Plekhova N. G., Krylova N. V., et al. The fatal case of lyssavirus encephalitis in the Russian Far East. In: *Encephalitis*. Ed. by S. E. Tkachev. Croatia: InTechOpen; 2013; Chapter 13: 231–250. <https://doi.org/10.5772/52869>

9. Poleshchuk E. M., Tagakova D. N., Sidorov G. N., Orlova T. S., Gordeiko N. S., Kaisarov A. Zh. Lethal cases of lyssavirus encephalitis in humans after contact with bats in the Russian Far East in 2019–2021. *Problems of Virology*. 2023; 68 (1): 45–58. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-156>

10. Badrane H., Tordo N. Host switching in *Lyssavirus* history from the Chiroptera to the Carnivora orders. *Journal of Virology*. 2001; 75 (17): 8096–8104. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.17.8096-8104.2001>

11. Bourhy H., Reynes J.-M., Dunham E. J., Dacheux L., Larrous F., Huang V. T., et al. The origin and phylogeography of dog rabies virus. *Journal of General Virology*. 2008; 89 (11): 2673–2681. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/003913-0>

12. Kuzmin I. V., Hughes G. J., Botvinkin A. D., Gribencha S. G., Rupprecht C. E. Arctic and Arctic-like rabies viruses: distribution, phylogeny and evolutionary history. *Epidemiology and Infection*. 2008; 136 (4): 509–519. <https://doi.org/10.1017/s095026880700903x>

13. Kuzmin I. V., Shi M., Orciari L. A., Yager P. A., Velasco-Villa A., Kuzmina N. A., et al. Molecular inferences suggest multiple host shifts of rabies viruses from bats to mesocarnivores in Arizona during 2001–2009. *PLoS Pathogens*. 2012; 8 (6): e1002786. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002786>

14. Biek R., Henderson J. C., Waller L. A., Rupprecht C. E., Real L. A. A high-resolution genetic signature of demographic and spatial expansion in epizootic rabies virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007; 104 (19): 7993–7998. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700741104>

15. Davis R., Nadin-Davis S. A., Moore M., Hanlon C. Genetic characterization and phylogenetic analysis of skunk-associated rabies viruses in North America with special emphasis on the central plains. *Virus Research*. 2013; 174 (1–2): 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.02.008>

16. Kuzmina N. A., Lemey P., Kuzmin I. V., Mayes B. C., Ellison J. A., Orciari L. A., et al. The phylogeography and spatiotemporal spread of south-central skunk rabies virus. *PLoS ONE*. 2013; 8 (12): e82348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082348>

17. Bourhy H., Kissi B., Audry L., Smreczak M., Sadkowska-Todys M., Kulonen K., et al. Ecology and evolution of rabies virus in Europe. *Journal of General Virology*. 1999; 80 (10): 2545–2557. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-10-2545>

18. Nel L. H., Sabeta C. T., von Teichman B., Jaftha J. B., Rupprecht C. E., Bingham J. Mongoose rabies in southern Africa: a re-evaluation based on molecular epidemiology. *Virus Research*. 2005; 109 (2): 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.12.003>

19. Oem J.-K., Kim S.-H., Kim Y.-H., Lee M.-H., Lee K.-K. Complete genome sequences of three rabies viruses isolated from rabid raccoon dogs and a cow in Korea. *Virus Genes*. 2013; 47 (3): 563–568. <https://doi.org/10.1007/s11262-013-0923-1>

20. Tsai K. J., Hsu W. C., Chuang W. C., Chang J. C., Tu Y. C., Tsai H. J., et al. Emergence of a sylvatic enzootic formosan ferret badger-associated rabies in Taiwan and the geographical separation of two phylogenetic groups of rabies viruses. *Veterinary Microbiology*. 2016; 182: 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.10.030>

21. Zhao J., Liu Y., Zhang S., Zhang F., Wang Y., Mi L., et al. Molecular characterization of three ferret badger (*Melogale moschata*) rabies virus isolates from Jiangxi province, China. *Archives of Virology*. 2014; 159 (8): 2059–2067. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2044-0>

22. Kuzmin I. V., Botvinkin A. D., McElhinney L. M., Smith J. S., Orciari L. A., Hughes G. J., et al. Molecular epidemiology of terrestrial rabies in the former Soviet Union. *Journal of Wildlife Diseases*. 2004; 40 (4): 617–631. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.4.617>

23. Deviatkin A. A., Lukashev A. N., Poleshchuk E. M., Dedkov V. G., Tkachev S. E., Sidorov G. N., et al. The phylodynamics of the rabies virus in the Russian Federation. *PLoS ONE*. 2017; 12 (2): e0171855. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171855>

24. Chupin S. A., Sprygin A. V., Zinyakov N. G., Guseva N. A., Shcherbinin S. V., Korennoy F. I., et al. Phylogenetic characterization of rabies virus field isolates collected from animals in European Russian Regions in 2009–2022. *Microorganisms*. 2023; 11 (10): 2526. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102526>

25. Bustin S. A., Ruijter J. M., van den Hoff M. J. B., Kubista M., Pfaffl M. W., Shipley G. L., et al. MIQE 2.0: Revision of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments Guidelines. *Clinical Chemistry*. 2025; 71 (6): 634–651. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaf043>

26. Validation of diagnostic assays for infectious diseases of terrestrial animals. In: *WOAH. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2023; Chapter 1.1.6. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.06_VALIDATION.pdf

27. Mittelberger C., Obkircher L., Oberkofler V., Ianeselli A., Kerschbamer C., Gallmetzer A., et al. Development of a universal endogenous qPCR control for eukaryotic DNA samples. *Plant Methods*. 2020; 16:53. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00597-2>

28. Hall T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999; 41: 95–98.

29. Troupin C., Dacheux L., Tanguy M., Sabeta C., Blanc H., Bouchier C., et al. Large-scale phylogenomic analysis reveals the complex evolutionary history of rabies virus in multiple carnivore hosts. *PLoS Pathogens*. 2016; 12 (12): e1006041. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006041>

30. Bustin S., Huggett J. qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*. 2017; 14: 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>

31. Freuling C. M., Hoffmann B., Fischer M., McElhinney L. M., Marston D. A., Fooks A. R., Müller T. F. Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction for the Demonstration of Lyssavirus Nucleic Acid. In: *Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research, and Prevention*. Ed. by C. Rupprecht, T. Nagarajan. San Diego: Academic Press; 2014; Chapter 7: 75–84. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800014-4.00007-X>

32. Toussaint J. F., Sailleau C., Breard E., Zientara S., De Clercq K. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *Journal of Virological Methods*. 2007; 140 (1–2): 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.007>
33. Fischer M., Wernike K., Freuling C. M., Müller T., Aylan O., Brochier B., et al. A step forward in molecular diagnostics of lyssaviruses – results of a ring trial among European laboratories. *PLoS ONE*. 2013; 8 (3): e58372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058372>
34. Wakeley P. R., Johnson N., McElhinney L. M., Marston D., Sawyer J., Fooks A. R. Development of a real-time, TaqMan reverse transcription-PCR assay for detection and differentiation of lyssavirus genotypes 1, 5, and 6. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43 (6): 2786–2792. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.6.2786-2792.2005>
35. Stuchin M., Machalaba C. M., Olival K. J., Artois M., Bengis R. G., Caceres-Soto P., et al. Rabies as a threat to wildlife. *Revue Scientifique et Technique*. 2018; 37 (2): 341–357. <https://doi.org/10.20506/rst.37.2.2858>
36. Nakajima-Iijima S., Hamada H., Reddy P., Kakunaga T. Molecular structure of the human cytoplasmic beta-actin gene: interspecies homology of sequences in the introns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985; 82 (18): 6133–6137. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.18.6133>
37. Vedula P., Kurosaka S., Leu N. A., Wolf Y. I., Shabalina S. A., Wang J., et al. Diverse functions of homologous actin isoforms are defined by their nucleotide, rather than their amino acid sequence. *eLife*. 2017; 6:e31661. <https://doi.org/10.7554/eLife.31661>
38. Chupin S. A., Botvinkin A. D., Zarva I. D., Chernyshova E. V. Phylogenetic analysis and the spatial spread of arctic rabies virus in Chukotka. *Acta Biologica Sibirica*. 2024; 10: 1805–1817. <https://doi.org/10.5281/zenodo.14555704>
39. Chupin S. A., Chernyshova E. V., Chernyshev R. S., Gruzdev K. N., Spiridonov A. N., Varkentin A. V., et al. Phylogenetic analysis of rabies virus isolates recovered from animals in Volgograd Oblast. *Veterinary Science Today*. 2025; 14 (3): 241–248. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2025-14-3-241-248>
40. Botvinkin A. D., Zarva I. D., Meltsov I. V., Chupin S. A., Poleschuk E. M., Zinyakov N. G., et al. Rabies re-emergence after long-term disease freedom (Amur Oblast, Russia). *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (4): 309–318. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-4-309-318>
41. Yakovchits N. V., Adelshin R. V., Zarva I. D., Chupin S. A., Melnikova O. V., Andaev E. I., et al. Fox rabies outbreaks in the republic of Buryatia: Connections with neighbouring areas of Russia, Mongolia and China. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2021; 68 (2): 427–434. <https://doi.org/10.1111/tbed.13692>
42. Dedkov V. G., Deviatkin A. A., Poleschuk E. M., Safonova M. V., Markelov M. L., Shipulin G. A. Development and evaluation of the RT-PCR kit for the rabies virus diagnosis. *Problems of virology*. 2016; 61 (5): 235–240. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-4-235-240> (in Russ.)
43. Allawi H. T., Santa Lucia J. Jr. Thermodynamics and NMR of internal G.T mismatches in DNA. *Biochemistry*. 1997; 36 (34): 10581–10594. <https://doi.org/10.1021/bi962590c>
44. Kubista M., Andrade J. M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006; 27 (2–3): 95–125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>
45. de Almeida Campos A. C., Melo F. L., Romano C. M., Araujo D. B., Cunha E. M. S., Sacramento D. A. V., et al. One-step protocol for amplification of near full-length cDNA of the rabies virus genome. *Journal of Virological Methods*. 2011; 174 (1–2): 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.03.030>

Поступила в редакцию / Received 26.06.2026

Поступила после рецензирования / Revised 31.07.2026

Принята к публикации / Accepted 14.08.2026

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Чупин Сергей Александрович, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник референтной лаборатории по бешенству и BSE ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-2114-5589>, chupin@arriah.ru

Sergei A. Chupin, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Reference Laboratory for Rabies and BSE, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-2114-5589>, chupin@arriah.ru

Чернышова Елена Владимировна, канд. вет. наук, заведующий референтной лабораторией по бешенству и BSE ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-4054-8532>, chernishova@arriah.ru

Elena V. Chernyshova, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Head of Reference Laboratory for Rabies and BSE, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-4054-8532>, chernishova@arriah.ru

Чуфарова Екатерина Александровна, канд. вет. наук, младший научный сотрудник референтной лаборатории по бешенству и BSE ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0009-0008-4992-6695>, chufarova@arriah.ru

Ekaterina A. Chufarova, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Junior Researcher, Reference Laboratory for Rabies and BSE, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0009-0008-4992-6695>, chufarova@arriah.ru

Вклад авторов: Чупин С. А. – формирование идеи, формулировка и развитие ключевых целей и задач, проведение исследований, анализ и интерпретация полученных данных, подготовка и редактирование текста; Чернышова Е. В. – принятие ответственности за все аспекты работы, целостность всех частей статьи и за ее окончательный вариант; Чуфарова Е. А. – выполнение отдельных этапов экспериментальной работы.

Contribution of the authors: Chupin S. A. – conception of the idea, formulation and development of the key objectives and tasks, conducting research, analysis and interpretation of the obtained data, preparation and editing of the text; Chernyshova E. V. – responsible for all aspects of the work, ensuring the integrity of all parts of the article and its final version; Chufarova E. A. – performing individual stages of the experimental work.



<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-273-279>
УДК 619:616.995.132.5:612.017.1:636.7



Цитокиновый профиль и баланс Th1/Th2-ответа в механизмах развития аутоиммунной патологии у собак с дирофиляриозом

И. О. Пивоварова, И. Г. Гламаздин, А. А. Руденко, В. И. Луцай

ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Волоколамское шоссе, 11, г. Москва, 125080, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Дирофиляриоз собак – широко распространенный трансмиссивный гельминтоз, при котором иммунный ответ на паразита и его эндосимбионта *Wolbachia* играет ключевую роль в патогенезе, однако механизмы формирования аутоиммунных осложнений изучены недостаточно.

Цель исследования. Изучить цитокиновый профиль, баланс Th1/Th2-ответа и их взаимосвязь с эозинофилией, гиперпродукцией IgE и образованием циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) у собак с разной тяжестью дирофиляриоза.

Материалы и методы. В исследование включено 113 собак: 26 клинически здоровых (контроль) и 87 больных дирофиляриозом, разделенных на четыре группы по степени тяжести (I–IV). Концентрации ФНО- α , ИЛ-1 α , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИНФ- γ и общего IgE определяли методом иммуноферментного анализа. Подсчет эозинофилов проводили в рамках клинического анализа крови. Статистическую обработку выполняли с использованием критериев Краскела – Уоллиса и Манна – Уитни.

Результаты. У больных собак выявлен выраженный цитокиновый шторм: уровень ИЛ-4 в группе IV превышал контроль в 4,7 раза ($p < 0,001$), ИЛ-6 – в 4,3 раза, ИЛ-8 – в 7,5 раза, ФНО- α – в 3,3 раза. Соотношение ИЛ-4/ИНФ- γ возрастало с 3,01 в контроле до 3,17–3,58 в группах III–IV, указывая на доминирование Th2-ответа. Относительное содержание эозинофилов повышалось в группах I–II [до (5,54–6,04)%, $p < 0,01$] и снижалось в группе IV [до (2,44 $\pm$ 0,54)%, $p < 0,05$]. Уровень общего IgE прогрессивно нарастал от (15,20 $\pm$ 1,80) Ед/мл в контроле до (92,50 $\pm$ 10,60) Ед/мл в группе IV. Общие ЦИК в группе IV достигали (57,31 $\pm$ 2,05) Ед/мл [контроль: (28,60 $\pm$ 0,87) Ед/мл, $p < 0,001$]. Корреляционный анализ показал положительную связь ИЛ-4 с IgE ($r = 0,78$, $p < 0,01$) и общими ЦИК ($r = 0,71$, $p < 0,01$).

Заключение. Доминирование Th2-ответа в сочетании с цитокиновым штормом инициирует каскад реакций, включающий гиперпродукцию IgE и эозинофилию, и способствует массивному образованию иммунных комплексов, что создает патогенетическую основу для развития аутоиммунной патологии при дирофиляриозе собак.

Ключевые слова: дирофиляриоз, цитокины, Th1/Th2-баланс, аутоиммунная патология, интерлейкины, иммунные комплексы, IgE

Благодарности: Авторы выражают благодарность доктору ветеринарных наук, профессору, академику РАН Борису Вениаминовичу Уше за консультативную поддержку.

Для цитирования: Пивоварова И. О., Гламаздин И. Г., Руденко А. А., Луцай В. И. Цитокиновый профиль и баланс Th1/Th2-ответа в механизмах развития аутоиммунной патологии у собак с дирофиляриозом. *Ветеринария сегодня*. 2026; 15 (3): 273–279. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-273-279>

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Пивоварова Ирина Олеговна, аспирант Института ветеринарии, ветеринарно-санитарной экспертизы и агробезопасности, РОСБИОТЕХ, Волоколамское шоссе, 11, г. Москва, 125080, Россия, irapivovarova66@gmail.com

Cytokine profile and Th1/Th2 balance in the mechanisms of autoimmune pathology development in dogs with dirofilariasis

Irina O. Pivovarova, Igor G. Glamazdin, Andrey A. Rudenko, Vladimir I. Lutsay

Russian Biotechnological University, Volokolamskoe shosse, 11, Moscow 125080, Russia

ABSTRACT

Introduction. Canine dirofilariasis is a widespread vector-borne helminthiasis in which the immune response to the parasite and its endosymbiont *Wolbachia* plays a key role in pathogenesis; however, the mechanisms underlying the development of autoimmune complications remain insufficiently studied.

Objective. To investigate the cytokine profile, Th1/Th2 balance, and their relationship with eosinophilia, hyperproduction of IgE, and the formation of circulating immune complexes (CICs) in dogs with varying severity of dirofilariasis.

Materials and methods. The study included 113 dogs: 26 clinically healthy animals (control group) and 87 dogs diagnosed with dirofilariasis, divided into four groups (I–IV) according to disease severity. Concentrations of TNF- α , IL-1 α , IL-4, IL-6, IL-8, IFN- γ , and total IgE were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Eosinophil counts were performed as part of the complete blood count. Statistical analysis was carried out using the Kruskal – Wallis and Mann – Whitney U tests.

Results. In diseased dogs, a pronounced cytokine storm was observed: IL-4 levels in group IV exceeded the control by 4.7-fold ($p < 0.001$), IL-6 by 4.3-fold, IL-8 by 7.5-fold, and TNF- α by 3.3-fold. The IL-4/IFN- γ ratio increased from 3.01 in the control group to 3.17–3.58 in groups III–IV, indicating a predominant Th2-type immune response. The relative eosinophil count increased in groups I–II [up to (5.54–6.04)%, $p < 0.01$] and decreased in groups IV [up to (2.44 $\pm$ 0.54)%, $p < 0.05$]. Total IgE levels progressively rose from (15.20 $\pm$ 1.80) U/mL in the control group to

© Пивоварова И. О., Гламаздин И. Г., Руденко А. А., Луцай В. И., 2026

(92.50 ± 10.60) U/mL in group IV. Total CICs in group IV reached (57.31 ± 2.05) U/mL [control: (28.60 ± 0.87) U/mL, $p < 0.001$]. Correlation analysis revealed a positive association between IL-4 and IgE ($r = 0.78$, $p < 0.01$) as well as between IL-4 and total CICs ($r = 0.71$, $p < 0.01$).

Conclusion. The predominance of the Th2-type immune response, combined with a cytokine storm, triggers a cascade of reactions, including IgE hyperproduction and eosinophilia, and promotes massive formation of immune complexes. This creates a pathogenetic basis for the development of autoimmune pathology in canine dirofilariasis.

Keywords: dirofilariasis, cytokines, Th1/Th2 balance, autoimmune pathology, interleukins, immune complexes, IgE

Acknowledgements: The authors are grateful to Dr. Boris V. Usha, Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, and Academician of the Russian Academy of Sciences, for his valuable consultative support.

For citation: Pivovarova I. O., Glamazdin I. G., Rudenko A. A., Lutsay V. I. Cytokine profile and Th1/Th2 balance in the mechanisms of autoimmune pathology development in dogs with dirofilariasis. *Veterinary Science Today*. 2026; 15 (3): 273–279. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-273-279>

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

For correspondence: Irina O. Pivovarova, Postgraduate Student, Institute of Veterinary Medicine, Veterinary Sanitary Expertise and Agricultural Safety, Russian Biotechnological University, Volokolamskoe shosse, 11, Moscow 125080, Russia, irapivovarova66@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Дирофиляриоз собак (canine heartworm disease) представляет собой опасное трансмиссивное гельминтозное заболевание, этиологическим агентом которого выступает филяриозная нематода *Dirofilaria immitis*. Возбудитель передается через укусы кровососущих комаров родов *Aedes*, *Culex* и *Anopheles*, что определяет широкое географическое распространение инвазии в регионах с теплым и умеренно континентальным климатом.

На сегодняшний день дирофиляриоз регистрируется на всех континентах, а в Российской Федерации очаги энзоотии охватывают южные и центральные области, причем в последние десятилетия наблюдается тенденция к постепенному расширению ареала заболевания в сторону северных широт, что связывают с глобальными климатическими изменениями и увеличением популяций переносчиков.

Патогенез дирофиляриоза традиционно рассматривался сквозь призму механической обструкции: взрослые половозрелые гельминты, локализуясь в правых отделах сердца, легочной артерии и ее ветвях, вызывают хроническую эндотелиальную травму, повышение сосудистого сопротивления и прогрессирующую легочную гипертензию. Однако накопленные за последние годы экспериментальные и клинические данные убедительно свидетельствуют о том, что ведущую роль в развитии системных органов поражений играют не столько механические факторы, сколько иммуноопосредованные механизмы, запускаемые продуктами метаболизма и распада паразита [1, 2, 3].

В этом контексте особое внимание исследователей приковано к эндосимбиотической бактерии *Wolbachia pipientis*, облигатному внутриклеточному микроорганизму, колонизирующему гонады, гиподерму и другие ткани филярий. Поверхностный белок *Wolbachia* (WSP) и высвобождаемые бактериальные липопroteиды распознаются рецепторами (TLR2 и TLR6) клеток врожденного иммунитета хозяина, что приводит к активации NF-сигнального пути и каскадной продукции провоспалительных цитокинов, в частности интерлейкина-8 (ИЛ-8), фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) и интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β) [4, 5]. Данный процесс приобретает клиническое значение при гибели гельминтов,

когда происходит массивный выброс бактериальных антигенов, способный индуцировать системную воспалительную реакцию, сходную с синдромом системного воспалительного ответа. Предполагается, что иммунный ответ при хронических филяриозах характеризуется классической Th2-поляризацией, что является эволюционно закрепленным механизмом, направленным на ограничение воспалительного повреждения тканей и обеспечение длительного выживания паразита в организме хозяина. Возможно, данный тип реагирования сопровождается повышением продукции интерлейкина-4 (ИЛ-4), интерлейкина-5 (ИЛ-5) и интерлейкина-13 (ИЛ-13), гиперпродукцией иммуноглобулина E (IgE), эозинофилией периферической крови и тканевой эозинофильной инфильтрацией [6, 7, 8, 9]. При этом интерлейкин-10 (ИЛ-10), классический противовоспалительный цитокин, секретируемый как регуляторными Т-клетками, так и самими активированными макрофагами, играет критическую роль в подавлении эффекторных Th1-зависимых реакций, что способствует формированию иммунологической толерантности и хронизации инвазионного процесса. В работах R. Morchón et al. было убедительно показано, что у собак с микрофиляриемией, то есть при активной продукции личинок половозрелыми самками, экспрессия мРНК ИЛ-4 и ИЛ-10 в циркулирующих мононуклеарных клетках крови достоверно выше, чем у животных с амикрофиляриемической формой инвазии, при которой микрофилярии в крови не обнаруживаются, несмотря на наличие взрослых гельминтов [10].

Эти данные указывают на то, что микрофилярии или секретируемые ими молекулы активно модулируют иммунный ответ в сторону толерантогенного Th2-фенотипа, обеспечивая защиту гельминтов как личиночных, так и взрослых стадий от элиминации. В то же время инверсия иммунного баланса возникает в ситуациях, сопровождающихся повреждением или гибелью тканей паразита. Спонтанный лизис взрослых *D. immitis*, а также их быстрая деструкция под влиянием макроциклических лактонов или других терапевтических агентов обуславливают молниеносное высвобождение высокоиммуногенных паразитарных и бактериальных антигенов. Этот процесс запускает так называемый цитокиновый шторм – острую гиперпродукцию широкого

спектра провоспалительных медиаторов, включая ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-1 β и хемокин CXCL8, что клинически проявляется гипертермией, тахипноэ, гипотензией и в тяжелых случаях может приводить к тромбоэмболии легочной артерии с фатальным исходом [11, 12, 13].

Таким образом, динамическое равновесие между Th2-ассоциированными регуляторными факторами и провоспалительными Th1/Th17-эффекторами определяет не только характер течения инвазии, но и риск развития жизнеугрожающих осложнений. Неотъемлемой составляющей гуморального иммунного ответа при дирофиляриозе является образование циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), состоящих из растворимых паразитарных антигенов и специфических антител, преимущественно классов IgG и IgM.

Избыточное накопление ЦИК в кровотоке при недостаточной эффективности системы мононуклеарных фагоцитов ведет к их осаждению на базальных мембранах капилляров клубочков почек, синовиальных оболочек суставов и эндотелии сосудов. Это инициирует активацию комплемента по классическому пути, привлечение нейтрофилов и макрофагов, а также высвобождение лизосомальных ферментов и реактивных форм кислорода, что клинически соответствует иммунокомплексному васкулиту, гломерулонефриту и полиартриту [9, 14, 15, 16]. Важно отметить, что у ряда собак с хронической инвазией выявляются аутоантитела к фосфатидилсерину и двухцепочечной ДНК, это прямо указывает на потерю иммунологической толерантности к собственным антигенам и формирование аутоиммунного компонента, усугубляющего системные проявления болезни [17].

Невзирая на объем исследовательских работ, посвященных отдельным звеньям иммунопатогенеза дирофиляриоза, комплексный анализ взаимосвязи между цитокиновым профилем, соотношением Th1- и Th2-типов реагирования, интенсивностью эозинофильного воспаления, уровнем общего и специфического IgE, а также концентрацией ЦИК у собак с различной степенью тяжести инвазии остается недостаточно разработанным. В частности, до сих пор открыты вопросы о том, какие именно цитокиновые кластеры являются предикторами формирования аутоиммунных нарушений и существует ли корреляция между гиперпродукцией IgE и риском гломерулопатии у данного вида животных.

Цель настоящей работы – изучить особенности цитокинового профиля и баланса Th1/Th2-ответа во взаимосвязи с показателями эозинофильного воспаления, гиперпродукции IgE и уровнем ЦИК у собак с дирофиляриозом для обоснования роли этих факторов в механизмах развития аутоиммунной патологии. Достижение поставленной цели позволит не только углубить фундаментальные представления о патогенезе дирофиляриоза, но и разработать критерии раннего прогнозирования иммунокомплексных осложнений, что имеет прямое прикладное значение для ветеринарной клинической практики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено в формате контролируемого поперечного (кросс-секционного) клинико-лабораторного наблюдения в период с 2023 по 2025 г. Объектом исследования являлись собаки ($n = 113$) в возрасте от 1 года до 8 лет [средний возраст $(4,2 \pm 0,3)$ года] различных пород (в том числе беспородные) и обоих полов (54 кобеля, 59 сук), поступившие на кафедру ветеринарной медицины ФГБОУ ВО «Российский

биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», а также в ветеринарные клиники городов Луганска, Донецка, Москвы и Московской области. Все владельцы животных подписали информированное добровольное согласие на проведение диагностических процедур и использование клинических данных в научных целях. Исследование одобрено локальным этическим комитетом университета (протокол № 42 от 15.02.2023).

Диагноз «дирофиляриоз» устанавливали на основании комплексного алгоритма, включавшего анализ анамнестических данных, физикальное обследование, эхокардиографию (ЭхоКГ) с доплеровским картированием, лабораторные тесты и визуализационные методы. Обязательным этапом являлась детекция микрофилярий в периферической крови с использованием модифицированного теста Кнотта: 1 мл венозной крови смешивали с 9 мл 2%-го раствора формальдегида, центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин, осадок окрашивали метиленовым синим и микроскопировали при увеличении 40х. Кроме того, все животные проходили иммунохроматографическое тестирование на наличие антигена взрослой *D. immitis* с применением коммерческого набора VetExpert Heartworm Ag (VetExpert, Польша), чувствительность и специфичность которого в условиях лаборатории составляли не менее 95 и 98% соответственно. В контрольную группу ($n = 26$) вошли клинически здоровые собаки, сопоставимые по возрасту и полу с основной группой, с отрицательными результатами всех вышеперечисленных диагностических тестов на дирофиляриоз, а также при отрицательных результатах паразитологического исследования фекалий (метод Фюллеборна) и серологических тестов на дирофиляриоз, лейшманиоз, эрлихиоз, анаплазмоз и боррелиоз (комбинированные иммунохроматографические тесты SNAP 4Dx Plus, IDEXX Laboratories, США). Это позволило минимизировать влияние сопутствующих векторно-трансмиссивных инфекций на анализируемые иммунологические показатели.

Группировка больных животных по тяжести течения. Больные животные ($n = 87$) были стратифицированы на четыре группы в соответствии с клинико-функциональной классификацией Американского общества по изучению дирофиляриоза (American Heartworm Society, AHS, пересмотр 2014 г.), которая учитывает совокупность клинических признаков, рентгенологических и эхокардиографических изменений. В группу I ($n = 24$) были включены собаки с бессимптомным течением либо минимальными транзиторными респираторными проявлениями при отсутствии рентгенологических изменений. Группа II ($n = 22$) – животные с умеренными респираторными симптомами (кашель, непереносимость физической нагрузки) и рентгенологическими признаками умеренной интерстициальной или сосудистой патологии. Группа III ($n = 23$) – пациенты с выраженной клинической картиной правожелудочковой недостаточности, подтвержденной эхокардиографической легочной гипертензией (систолическое давление в легочной артерии > 40 мм рт. ст.) и хакексией. Группа IV ($n = 18$) представлена животными с кавальным синдромом (обструкция tricuspid valve подвижными массами гельминтов) либо крайне тяжелым течением с полиорганной дисфункцией. Важным условием включения служило отсутствие сопутствующих инфекционных заболеваний (бруцеллез, лептоспироз, вирусный гепатит, парвовирусный энтерит), онкологических

Таблица 1

Концентрация цитокинов в сыворотке крови собак с диروفилариозом ($M \pm m$)

Table 1

Serum cytokine levels in dogs with dirofilariasis ($M \pm m$)

Показатель	Контроль ($n = 26$)	Группа I ($n = 24$)	Группа II ($n = 22$)	Группа III ($n = 23$)	Группа IV ($n = 18$)
ФНО- α , пг/мл	5,74 $\pm$ 0,19	7,12 $\pm$ 0,35*	8,57 $\pm$ 0,33*	11,93 $\pm$ 0,73*	19,11 $\pm$ 1,39*
ИЛ-4, пг/мл	175,42 $\pm$ 4,72	282,70 $\pm$ 9,06*	326,18 $\pm$ 17,50*	616,13 $\pm$ 35,84*	823,22 $\pm$ 51,08*
ИЛ-6, пг/мл	253,38 $\pm$ 7,90	368,91 $\pm$ 9,51*	426,36 $\pm$ 13,08*	563,69 $\pm$ 31,52*	1089,22 $\pm$ 66,20*
ИНФ- γ , пг/мл	58,30 $\pm$ 2,85	92,95 $\pm$ 4,86*	142,72 $\pm$ 11,87*	172,17 $\pm$ 10,92*	259,83 $\pm$ 15,76*
ИЛ-1 α , пг/мл	4,65 $\pm$ 3,61	2,69 $\pm$ 0,10*	5,40 $\pm$ 1,56*	5,07 $\pm$ 0,28*	8,69 $\pm$ 0,91*
ИЛ-8, пг/мл	1,26 $\pm$ 0,06	2,07 $\pm$ 0,12*	3,63 $\pm$ 0,28*	4,71 $\pm$ 0,33*	9,39 $\pm$ 1,04*

* $p < 0,001$ по сравнению с контролем (тест Манна – Уитни).* $p < 0.001$ vs. control (Mann – Whitney U test).

новообразований любой локализации, а также системных аутоиммунных расстройств, диагностированных ранее. Из выборки также исключались животные, получавшие иммуномодулирующую терапию (глюкокортикоиды, циклоспорин, неспецифические иммуностимуляторы) или противогельминтные препараты с макроциклическими лактонами в течение трех месяцев, предшествовавших исследованию, поскольку это могло исказить эндогенные цитокиновые и гуморальные профили.

Забор, обработка и хранение биологического материала. Венозную кровь отбирали из латеральной вены (*v. saphena lateralis*) в утренние часы натощак для минимизации суточных колебаний цитокинов и липидного фона. Использовались вакуумные системы двух типов: пробирки с K2-ЭДТА (Becton Dickinson, США) для гематологического анализа и получения цельной крови для микрофиляриоскопии, а также пробирки без антикоагулянта с активатором свертывания для выделения сыворотки. Сыворотку получали путем двукратного центрифугирования при 1500 g в течение 15 мин при +4 °C с последующим переносом супернатанта в стерильные полипропиленовые пробирки (Eppendorf, Германия). Аликвоты сыворотки (по 200 мкл) немедленно замораживали при температуре –80 °C с использованием ультранизкотемпературного морозильника (Thermo Fisher Scientific, США) и хранили в криобанках до проведения иммуноферментного анализа, избегая повторных циклов размораживания/замораживания.

Иммуноферментный и гематологический анализ. Концентрацию цитокинов в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с применением коммерческих наборов для видоспецифичной детекции собак: ФНО- α , интерлейкин-1 α (ИЛ-1 α), ИЛ-4, интерлейкин-6 (ИЛ-6), ИЛ-8 и интерферон- γ (ИНФ- γ) производства Cloud-Clone Corp. (Китай) и Wuhan USCN Business Co., Ltd. (Китай). Специфичность каждого набора подтверждена производителем методом перекрестных реакций с рекомбинантными белками других видов, внутри- и межсерийный коэффициенты вариации не превышали 8 и 12% соответственно. Оптическую плотность измеряли на планшетном ридере Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, USA) при длине волны 450 нм с референс-фильтром 620 нм. Калибровочные кривые строились с использованием стандартных образцов, прилагаемых к каждому набору, с четырехпараметрической логистической регрессией. Уровень общего IgE в сыворотке определяли аналогичным иммуноферментным методом с использованием наборов той же группы производителей. Содержание ЦИК оценивали двумя методами: общий

уровень – преципитацией с полиэтиленгликолем (ПЭГ-6000) с последующей турбидиметрией при длине волны 450 нм; фракционный состав по молекулярной массе – методом дифференциального преципитирования с 2, 4 и 7% ПЭГ, что позволяло выделить мелкие (2,5–8,5S), средние (8,5–19S) и крупные (> 19S) фракции. Абсолютное и относительное количество эозинофилов периферической крови определяли на автоматическом гематологическом анализаторе Mindray BC-5000 (Mindray Medical, Китай) с дифференцировкой лейкоцитарной формулы по 200 клеткам в окрашенных по Романовскому – Гимзе мазках для верификации автоматических данных. Референсные интервалы для эозинофилов у собак составляли (0,1–1,2) $\times 10^9$ /л [2–8%].

Статистическая обработка данных. Все расчеты выполнены в среде Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Проверку нормальности распределения количественных переменных осуществляли с использованием критерия Шапиро – Уилка, а также визуальной оценкой Q–Q графиков. Ввиду того что большинство показателей (концентрации цитокинов, IgE, ЦИК) не подчинялись закону нормального распределения ($p < 0,05$), все последующие сравнения проводились непараметрическими методами. Для выявления различий между четырьмя группами больных животных применяли ранговый дисперсионный анализ ANOVA Краскела – Уоллиса; при обнаружении статистически значимых различий выполняли попарные межгрупповые сравнения с использованием U-критерия Манна – Уитни с введением поправки Бонферрони для контроля семейной ошибки (скорректированный уровень значимости $\alpha' = 0,05 / 6 = 0,0083$). Взаимосвязь между количественными признаками оценивали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r_s). Различия и корреляции считали статистически значимыми при двустороннем уровне $p \leq 0,05$. Все количественные данные в тексте и таблицах представлены как среднее арифметическое и его стандартная ошибка ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цитокиновый профиль сыворотки крови собак опытных групп характеризовался значительным повышением как провоспалительных, так и противовоспалительных медиаторов относительно контроля, причем степень выраженности изменений нарастала параллельно тяжести заболевания (табл. 1).

Уровень ИЛ-4 – ключевого цитокина Th2-ответа – в группе I был выше контрольных значений в 1,6 раза ($p < 0,001$), в группе II – в 1,9 раза, в группе III – в 3,5 раза, а в группе IV достигал максимальной кратности 4,7 ($p < 0,001$). Подобная динамика полностью согласуется

Таблица 2

Показатели эозинофильного воспаления, IgE и ЦИК у собак с диروفилариозом (M ± m)

Table 2

Eosinophilic inflammatory markers, IgE, and CIC levels in dogs with dirofilariasis (M ± m)

Показатель	Контроль (n = 26)	Группа I (n = 24)	Группа II (n = 22)	Группа III (n = 23)	Группа IV (n = 18)
Эозинофилы, %	4,11 ± 0,25	6,04 ± 0,52**	5,54 ± 0,38**	4,43 ± 0,62	2,44 ± 0,54*
Эозинофилы, 10 ⁹ /л	0,37 ± 0,03	0,84 ± 0,22**	0,57 ± 0,04**	0,68 ± 0,91*	0,32 ± 0,07
Общий IgE, Ед/мл	15,20 ± 1,80	28,40 ± 3,20***	35,10 ± 4,10***	68,70 ± 7,30***	92,50 ± 10,60***
ЦИК общие, Ед/мл	28,60 ± 0,87	29,05 ± 1,00	29,21 ± 0,56	41,10 ± 0,83***	57,31 ± 2,05***
ЦИК крупные, Ед/мл	9,37 ± 0,30	10,62 ± 0,32**	9,72 ± 0,47	11,73 ± 0,32***	13,31 ± 0,80***
ЦИК средние, Ед/мл	9,30 ± 0,48	8,32 ± 0,47	7,53 ± 0,41**	9,08 ± 0,38	13,20 ± 1,08***
ЦИК мелкие, Ед/мл	9,92 ± 0,69	10,11 ± 0,73***	11,87 ± 0,36**	20,28 ± 0,55***	30,81 ± 1,47***

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – по сравнению с контролем для всех указанных групп (тест Манна – Уитни).* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. control for all indicated groups (Mann – Whitney U test).

с данными R. Morchón et al., продемонстрировавших избирательную гиперэкспрессию мРНК ИЛ-4 и ИЛ-10 у микрофиляриемичных собак, что отражает поляризацию иммунного ответа по Th2-типу [10]. Выраженный подъем ИЛ-4 именно при тяжелых формах, вероятно, обусловлен сочетанным действием антигенов микрофилярий и взрослых гельминтов, а также молекулярных паттернов *Wolbachia*, способных индуцировать как Th2-звено (через модуляцию дендритных клеток), так и врожденный воспалительный ответ [5].

Содержание ИНФ-γ, традиционно ассоциируемого с Th1-ответом, также существенно возрастало во всех группах больных собак, достигая у животных группы IV (259,83 ± 15,76) пг/мл [контроль – (58,30 ± 2,85) пг/мл, $p < 0,001$]. Этот факт не противоречит концепции Th2-доминирования, поскольку повышение ИНФ-γ может быть следствием активации NK-клеток и макрофагов под действием ИЛ-12 и ФНО-α в условиях массивного выброса антигенов [6]. Более информативным индикатором баланса Th1/Th2 служит соотношение цитокинов. Расчет коэффициента ИЛ-4/ИНФ-γ показал его прогрессивный рост с 3,01 в контроле до 3,58 в группе III и 3,17 в группе IV, тогда как соотношение ИНФ-γ/ИЛ-4, напротив, снижалось. Таким образом, несмотря на одновременную активацию обоих звеньев, баланс смещался в сторону Th2-ответа, что является характерным признаком иммунопатологии при хронических филяриозах [6, 10, 18, 19].

Провоспалительные цитокины, участвующие в формировании цитокинового шторма, также демонстрировали значимый рост. Сывороточная концентрация ИЛ-6, одного из главных медиаторов острофазного ответа и активатора В-клеток, в группе IV превышала контрольную в 4,3 раза ($p < 0,001$). ФНО-α, ключевой пироген и индуктор апоптоза, увеличился в 3,3 раза ($p < 0,001$), тогда как уровень ИЛ-8 – мощного хемоаттрактанта нейтрофилов – в 7,5 раза ($p < 0,001$). Эти результаты согласуются с данными W.-K. Yoon et al., которые наблюдали многократный подъем ИЛ-6 и С-реактивного белка после введения меларсомина, моделирующего гибель гельминтов, и подчеркивают роль *Wolbachia* в поддержании длительной воспалительной реакции [11]. Выявленная гиперпродукция ИЛ-8 подтверждает, что WSP вольбахий напрямую стимулирует нейтрофилы к секреции этого хемокина, что было убедительно показано на собачьих нейтрофилах *in vitro* [4, 20, 21, 22].

Концентрация ИЛ-1α также статистически значимо возрастала в терминальной стадии заболевания, в группе IV достигая (8,69 ± 0,91) пг/мл [контроль – (4,65 ± 3,61) пг/мл], хотя у здоровых животных отмечался значительный разброс, требующий дальнейшего изучения. Тем не менее тенденция к росту ИЛ-1α вносит дополнительный вклад в провоспалительный каскад, способствуя повреждению эндотелия и привлечению иммунокомпетентных клеток в очаги паразитарной инвазии.

Иммунологические последствия описанного цитокинового дисбаланса проявились изменениями со стороны эозинофильного звена, гуморального IgE-ответа и образования иммунных комплексов (табл. 2).

Относительное содержание эозинофилов у клинически здоровых собак составило (4,11 ± 0,25)%; в группе I значение возрастало до (6,04 ± 0,52)% [$p < 0,01$], отражая типичную для гельминтозов эозинофильную реакцию, опосредованную ИЛ-5, продукция которого стимулируется Th2-клетками [6]. Однако в группе III этот показатель снижался до (4,43 ± 0,62)% и становился достоверно ниже контроля в терминальной группе IV [(2,44 ± 0,54)%, $p < 0,05$]. Аналогичная динамика прослеживалась по абсолютному числу эозинофилов: увеличение в группе I [(0,84 ± 0,22) × 10⁹/л, $p < 0,01$], но снижение в группе IV до (0,32 ± 0,07) × 10⁹/л. Подобное изменение уровня циркулирующих эозинофилов при наиболее тяжелом течении диروفилариоза объясняется, вероятно, интенсивной миграцией клеток в ткани (легочные артерии, почечные клубочки), где они дегранулируют, выделяя токсические белки и подерживая локальное воспаление [23, 24, 25]. Ранее G. Barlozzari et al. также наблюдали нормализацию количества эозинофилов после элиминации микрофилярий, подтверждая прямую связь паразитемии с уровнем циркулирующих эозинофилов [23].

Концентрация общего IgE в сыворотке крови неуклонно повышалась от (15,20 ± 1,80) Ед/мл в контроле до (92,50 ± 10,60) Ед/мл в группе IV ($p < 0,001$). Увеличение было статистически значимым уже в группе I [(28,40 ± 3,20) Ед/мл, $p < 0,001$], а в группах III и IV достигало 4–6-кратного превышения. Столь резкий подъем IgE является прямым следствием Th2-поляризации, поскольку ИЛ-4 индуцирует переключение синтеза В-лимфоцитами на IgE, что подтверждается тесной корреляцией гиперпродукции ИЛ-4 с повышенным уровнем общего IgE ($r = 0,78$, $p < 0,01$) [6, 22, 26]. Высокий уровень IgE, в свою очередь,

способствует сенсibilизации тучных клеток и базофилов, запуская реакции гиперчувствительности немедленного типа, что при персистенции паразита создает постоянный провоспалительный фон и способствует повреждению эндотелия.

Одним из ключевых индикаторов иммунокомплексной патологии служит уровень ЦИК. В нашем исследовании общие ЦИК в группах I и II практически не отличались от контроля, что согласуется с данными R. Iatta et al., не выявивших повышения ЦИК у клинически здоровых собак с дирофиляриозом [14]. Однако у больных животных из групп III и IV наблюдался резкий подъем показателя до $(41,10 \pm 0,83)$ и $(57,31 \pm 2,05)$ Ед/мл соответственно ($p < 0,001$). Примечательно, что наиболее значительный рост регистрировался за счет фракции мелких ЦИК $[(20,28 \pm 0,55)$ Ед/мл в группе III и $(30,81 \pm 1,47)$ Ед/мл в группе IV], которые обладают наибольшим патогенным потенциалом, легко проникая через базальную мембрану сосудов и откладываясь в тканях. Повышение уровня общих и мелких ЦИК положительно коррелировало с концентрацией ИЛ-4 ($r = 0,71$, $p < 0,01$) и IgE ($r = 0,66$, $p < 0,01$), что подтверждает патогенетическую цепочку: Th2-доминирование приводит к гиперпродукции антител, что в итоге способствует образованию иммунных комплексов.

Связь между гиперпродукцией IgE, эозинофилией и иммунокомплексным повреждением тканей объясняет механизмы аутоиммунизации при дирофиляриозе. В условиях хронической антигенной стимуляции и деструкции тканей, вызванной гельминтами и их эндосимбионтами, происходит высвобождение скрытых аутоантигенов, которые в присутствии избытка ИЛ-4 и активированных В-клеток становятся мишенями для аутоантител. Формирующиеся *in situ* иммунные комплексы фиксируют комплемент, индуцируя васкулиты и гломерулонефриты, что типично для аутоиммунной патологии [15, 27]. Выявленная нами корреляционная связь между уровнем ИЛ-4 и концентрацией ЦИК (особенно мелких) позволяет рассматривать соотношение ИЛ-4/ИНФ- γ не только как маркер Th-баланса, но и как потенциальный предиктор риска развития иммунокомплексных осложнений.

Полученные результаты позволяют предложить следующую схему иммунопатогенеза: присутствие гельминтов и персистенция *Wolbachia* индуцируют мощный провоспалительный ответ с повышением ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-1 α и ИЛ-8, что составляет основу цитокинового шторма. Одновременно антигены паразита, особенно микрофилярий, стимулируют Th2-поляризацию с резким подъемом ИЛ-4, который, с одной стороны, ограничивает чрезмерное воспаление (через индукцию ИЛ-10), а с другой – инициирует гиперпродукцию IgE и эозинофилию. В условиях массивного поступления антигенов при гибели гельминтов избыточные антитела формируют иммунные комплексы, которые перестают эффективно элиминироваться и начинают откладываться в тканях, вызывая повреждение по механизму гиперчувствительности III типа. Активация комплемента, привлечение нейтрофилов и дегрануляция эозинофилов в очагах отложения комплексов создают замкнутый круг воспаления и некроза, что способствует высвобождению новых порций аутоантигенов и развитию аутоиммунной патологии [1, 7, 15, 28].

ВЫВОДЫ

1. У собак с дирофиляриозом регистрируется выраженный цитокиновый шторм: в группе IV содержание ФНО- α повышено в 3,3 раза, ИЛ-6 – в 4,3 раза, ИЛ-8 – в 7,5 раза по сравнению со здоровыми животными.

2. Соотношение ИЛ-4/ИНФ- γ увеличивается с 3,01 в контроле до 3,58 в группе III, что свидетельствует о доминировании Th2-иммунного ответа на фоне общей активации цитокиновой сети.

3. Гиперпродукция ИЛ-4 тесно коррелирует с повышенным уровнем общего IgE ($r = 0,78$, $p < 0,01$) и, на начальных стадиях, с эозинофилией; при тяжелом течении эозинофилы периферической крови снижаются, что указывает на их перераспределение в ткани.

4. В группах III и IV наблюдаются многократное увеличение общих и особенно мелких ЦИК, положительно связанное с уровнем ИЛ-4 и IgE, что подтверждает роль Th2-доминирования и цитокинового шторма в индукции иммунокомплексной патологии и создает основу для развития аутоиммунных осложнений при дирофиляриозе собак.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Simón F., Kramer L. H., Román A., Blasini W., Morchón R., Marcos-Atxutegi C., et al. Immunopathology of *Dirofilaria immitis* infection. *Veterinary Research Communications*. 2007; 31 (2): 161–171. <https://doi.org/10.1007/s11259-006-3387-0>
- McCall J. W., Genchi C., Kramer L. H., Guerrero J., Venco L. Chapter 4. Heartworm disease in animals and humans. *Advances in Parasitology*. 2008; 66: 193–285. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)00204-2](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)00204-2)
- Latrofa M. S., Varotto-Bocazzi I., Louzada-Flores V. N., Iatta R., Mendoza-Roldan J. A., Roura X., et al. Interaction between *Wolbachia pipiens* and *Leishmania infantum* in heartworm infected dogs. *Parasites & Vectors*. 2023; 16 (1):77. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05662-y>
- Bazzocchi C., Genchi C., Paltrinieri S., Lecchi C., Mortarino M., Bandi C. Immunological role of the endosymbionts of *Dirofilaria immitis*: the *Wolbachia* surface protein activates canine neutrophils with production of IL-8. *Veterinary Parasitology*. 2003; 117 (1–2): 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.07.013>
- Marriott A. E., Dagley J. L., Hegde S., Steven A., Fricks C., DiCosto U., et al. *Dirofilaria immitis* mouse models for heartworm preclinical research. *Frontiers in Microbiology*. 2023; 14:1208301. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1208301>
- Гришина Е. А. Роль цитокинов в развитии иммунитета при гельминтозах. *Российский паразитологический журнал*. 2016; 38 (4): 521–526. <https://doi.org/10.12737/23077>
- Grishina E. A. The role of cytokines in the immunity development at helminthiasis. *Russian Journal of Parasitology*. 2016; 38 (4): 521–526. <https://doi.org/10.12737/23077> (in Russ.)
- Dong X., Xu J., Song H., Liu Y., Wu M., Zhang H., et al. Molecular characterization of a *Dirofilaria immitis* cysteine protease inhibitor (Cystatin) and its possible role in filarial immune evasion. *Genes*. 2019; 10 (4):300. <https://doi.org/10.3390/genes10040300>
- Martínez-Durán D., Mujika M., Morales M., Castillo J. A., Moreno B., Delacour-Estrella S., et al. Vector-borne pathogens in Spanish greyhounds from Central Spain: Prevalence and hematobiochemical findings. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. 2026; 68:101437. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2026.101437>
- Murillo D. F. B., Campbell E. J., Moorhead A. R., Wang C. Evaluation of diagnostic techniques for early detection of heartworm in experimentally infected dogs: identification of *Dirofilaria immitis*-derived microRNA in the initial 28 weeks post-inoculation. *Parasites & Vectors*. 2024; 17 (1):258. <https://doi.org/10.1186/s13071-024-06337-y>
- Morchón R., López-Belmonte J., Bazzocchi C., Grandi G., Kramer L., Simón F. Dogs with patent *Dirofilaria immitis* infection have higher expression of circulating IL-4, IL-10 and iNOS mRNA than those with occult infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2007; 115 (1–2): 184–188. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.10.004>
- Yoon W.-K., Kim Y.-W., Suh S.-I. L., Choi R., Lee S.-G., Hyun C. Evaluation of cardiopulmonary and inflammatory markers in dogs with heartworm infection during treatment with the 2014 American Heartworm Society recommended treatment protocol. *Parasites & Vectors*. 2017; 10 (Suppl. 2):S35. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2427-7>
- Kitoh K., Katoh H., Kitagawa H., Sasaki Y. Comparison of heartworm extract-induced shock and endotoxin-induced shock in dogs by determination of serum tumor necrosis factor concentrations. *American Journal of Veterinary Research*. 2001; 62 (5): 765–769. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.765>
- Starkey L. A., Bowles J. V., Blagburn B. L. Comparison of acid-versus heat-treatment for immune complex dissociation and detection of *Dirofilaria immitis* antigen in canine plasma. *Veterinary Parasitology*. 2020; 282:109134. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109134>

14. Iatta R., Paltrinieri S., Cavalera M. A., Scavone D., Otranto D., Zatelli A. Assessment of circulating immune complexes in canine leishmaniosis and dirofilariosis. *Veterinary Research Communications*. 2023; 47 (2): 707–712. <https://doi.org/10.1007/s11259-022-10031-8>
15. Bendas A. J. R., Mendes-de-Almeida F., Von Simson C., Labarthe N. Heat pretreatment of canine samples to evaluate efficacy of imidacloprid + moxidectin and doxycycline in heartworm treatment. *Parasites & Vectors*. 2017; 10 (1):246. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2189-2>
16. Ciuca L., Vismarra A., Lebon W., Beugnet F., Morchon R., Rinaldi L., et al. New insights into the biology, diagnosis and immune response to *Dirofilaria repens* in the canine host. *Veterinary Parasitology*. 2020; 277 (Suppl.):100029. <https://doi.org/10.1016/j.vpoa.2020.100029>
17. Montenegro V. M., Delgado Hernandez M., Rojas A., Rivera-Correa J. Autoantibodies against phosphatidylserine and DNA during canine *Dirofilaria immitis* infection. *Veterinary Parasitology*. 2025; 334:110392. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2025.110392>
18. Murillo D. F. B., Moye A., Wang C. Heat treatment augments antigen detection of *Dirofilaria immitis* in apparently healthy companion dogs (3.8% to 7.3%): Insights from a large-scale nationwide survey across the United States. *Pathogens*. 2024; 13 (1):56. <https://doi.org/10.3390/pathogens13010056>
19. Gruntmeir J., Long M., Blagburn B., Walden H. Improved antigen detection of male-only *Dirofilaria immitis* infections in canine serum after heat treatment for immune complex dissociation. *Parasitologia*. 2023; 3 (1): 79–86. <https://doi.org/10.3390/parasitologia3010010>
20. Murillo D. F. B., Wang C. Pre-treatment of canine plasma with heat, rather than acid, efficiently enhances *Dirofilaria immitis* antigen detection. *Parasites & Vectors*. 2023; 16 (1):463. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-06083-7>
21. Dagley J. L., DiCosto U., Fricks C., Mansour A., McCall S., McCall J. W., et al. Current status of immunodeficient mouse models as substitutes to reduce cat and dog use in heartworm preclinical research [version 1; peer review: 4 approved]. *F1000Research*. 2024; 13:484. <https://doi.org/10.12688/f1000research.149854.1>
22. Cavalera M. A., Paltrinieri S., Giordano A., Iatta R., Gernone F., Mendoza-Roldan J. A., et al. Serum protein electrophoresis in *Dirofilaria immitis* naturally infected dogs: Latest news and a systematic literature review. *Veterinary Parasitology*. 2022; 305:109720. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2022.109720>
23. Barlozzari G., Felice T., Salvato L., Conti R., De Liberato C., Furzi F., et al. Usual or unusual presentations of *Dirofilaria repens* in two sibling dogs: a case report. *Parasitology Research*. 2021; 120 (1): 109–115. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06926-7>
24. Smith R., Murillo D. F. B., Chenoweth K., Barua S., Kelly P. J., Starkey L., et al. Nationwide molecular survey of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in companion dogs and cats, United States of America. *Parasites & Vectors*. 2022; 15 (1):367. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05459-5>
25. Sturiale E., Napoli E., De Benedetto G., Gaglio G., Nonnis F., Varcasia A., et al. Antigen-blocking phenomenon in dogs affected by *Dirofilaria immitis*: frequency, reversion, associated immune response and co-positivity with other vector-borne pathogens. *Veterinary Parasitology*. 2026; 347:110891. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2026.110891>
26. Beall M. J., Arguello-Marin A., Drexel J., Liu J., Chandrashekar R., Alaman A. R. Validation of immune complex dissociation methods for use with heartworm antigen tests. *Parasites & Vectors*. 2017; 10 (Suppl. 2):481. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2442-8>
27. Constantinoiu C., Croton C., Paterson M. B. A., Knott L., Henning J., Mallyon J., Coleman G. T. Prevalence of canine heartworm infection in Queensland, Australia: comparison of diagnostic methods and investigation of factors associated with reduction in antigen detection. *Parasites & Vectors*. 2023; 16:63. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05633-9>
28. Wężyk D., Romanczuk K., Rodo A., Kavalevich D., Bajer A. Haematological indices and immune response profiles in dogs naturally infected and co-infected with *Dirofilaria repens* and *Babesia canis*. *Scientific Reports*. 2023; 13 (1):2028. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29011-2>

Поступила в редакцию / Received 25.06.2026

Поступила после рецензирования / Revised 03.08.2026

Принята к публикации / Accepted 26.08.2026

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Пивоварова Ирина Олеговна, аспирант Института ветеринарии, ветеринарно-санитарной экспертизы и агробезопасности, РОСБИОТЕХ, г. Москва, Россия; <https://orcid.org/0009-0002-7529-9118>, irapivovaro66@gmail.com

Irina O. Pivovarova, Postgraduate Student, Institute of Veterinary Medicine, Veterinary Sanitary Expertise and Agricultural Safety, Russian Biotechnological University, Moscow, Russia; <https://orcid.org/0009-0002-7529-9118>, irapivovaro66@gmail.com

Гламаздин Игорь Геннадьевич, д-р вет. наук, профессор, директор Института ветеринарии, ветеринарно-санитарной экспертизы и агробезопасности, РОСБИОТЕХ, г. Москва, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-7119-906X>, glamazdin@mgupp.ru

Igor G. Glamazdin, Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Director of the Institute of Veterinary Medicine, Veterinary Sanitary Expertise and Agricultural Safety, Russian Biotechnological University, Moscow, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-7119-906X>, glamazdin@mgupp.ru

Руденко Андрей Анатольевич, д-р вет. наук, профессор кафедры ветеринарной медицины Института ветеринарии, ветеринарно-санитарной экспертизы и агробезопасности, РОСБИОТЕХ, г. Москва, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-6434-3497>, rudenkoaa@mgupp.ru

Andrey A. Rudenko, Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor of the Department of Veterinary Medicine, Institute of Veterinary Medicine, Veterinary Sanitary Expertise and Agricultural Safety, Russian Biotechnological University, Moscow, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-6434-3497>, rudenkoaa@mgupp.ru

Луцай Владимир Иванович, д-р вет. наук, доцент, заведующий кафедрой ветеринарной медицины Института ветеринарии, ветеринарно-санитарной экспертизы и агробезопасности, РОСБИОТЕХ, г. Москва, Россия; <https://orcid.org/0009-0003-4668-2545>, lucajivi@mgupp.ru

Vladimir I. Lutsay, Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Veterinary Medicine, Institute of Veterinary Medicine, Veterinary Sanitary Expertise and Agricultural Safety, Russian Biotechnological University, Moscow, Russia; <https://orcid.org/0009-0003-4668-2545>, lucajivi@mgupp.ru

Вклад авторов: Пивоварова И. О. – проведение иммунологических и гематологических исследований, написание текста рукописи; Гламаздин И. Г. – разработка концепции, планирование эксперимента; Руденко А. А. – статистическая обработка материала, редактирование таблиц; Луцай В. И. – критический анализ, обсуждение полученных результатов исследования, редакция рукописи.

Contribution of the authors: Pivovarova I. O. – immunological and hematological studies, manuscript writing; Glamazdin I. G. – conceptualization, experimental design; Rudenko A. A. – statistical analysis, table editing; Lutsay V. I. – critical analysis, discussion of results, manuscript editing.



<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-280-289>
УДК 619:616-076:577.2:615.331.015.8:579.852.13



Разработка ПЦР-тест-систем для оценки распространённости генов антибиотикорезистентности у клостридий

Н. А. Безбородова¹, Т. И. Глотова², О. В. Соколова¹, И. А. Шкуратова¹, В. Д. Зубарева¹, Н. А. Мартынов¹, Е. В. Романов¹, А. Г. Готов²

¹ ФГБНУ «Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук» (ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН), ул. Белинского, 112а, г. Екатеринбург, 620142, Россия

² ФГБНУ «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук», Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока (ИЭВСИДВ СФНЦА РАН), р. п. Краснообск, 630501, Новосибирская область, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Актуальность данной работы обусловлена ростом антибиотикорезистентности у патогенных клостридий в агропромышленном комплексе Уральского федерального округа, что приводит к снижению эффективности терапии, увеличению экономических потерь от инфекционных заболеваний и создает угрозу межвидового переноса генов резистентности, подчеркивая необходимость разработки современных инструментов для молекулярного мониторинга в рамках реализации национальных стратегий по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам.

Цель исследования. Разработка и апробация ПЦР-тест-систем для детекции генов антибиотикорезистентности (*tetM/B*, *ermB/Q*, *bcrA/B/D/R*) у *Clostridium perfringens* и *Clostridium difficile*.

Материалы и методы. Исследовали 472 пробы биологического материала (фекалии и раневое отделяемое от животных, корма, объекты окружающей среды), отобранные в 2023–2024 гг. на 32 молочно-товарных предприятиях региона. Видовую принадлежность выделенных изолятов подтверждали методом MALDI-ToF-масс-спектрометрии, а фенотипическую устойчивость к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом в соответствии со стандартами EUCAST. С помощью ПЦР был сформирован банк ДНК, выделенной из поступивших проб биологического материала и изолятов клостридий, коллекционных штаммов различных видов спорообразующих анаэробов.

Результаты. В результате была создана и валидирована эффективная ПЦР-панель для детекции генов антимикробной резистентности у клостридий. Скрининг 123 проб, содержащих ДНК целевых патогенов, позволил выявить распространение генов антимикробной резистентности: доминирующим у *Clostridium difficile* являлся ген *ermB* (95,1%), у *Clostridium perfringens* – гены *ermB* (90,0%) и *ermQ* (67,1%). Ген *tetM* обнаруживали в 52,4 и 60,0% проб соответственно, гены *bcrA/B/D/R* – у 27,1–39,8% изолятов. Фенотипические исследования показали формирование у клостридий множественной лекарственной устойчивости.

Заключение. Разработанная тест-система стала надежным инструментом для молекулярного мониторинга антимикробной резистентности, полученные данные свидетельствуют о массовой циркуляции клостридий с генетическим потенциалом резистентности к клинически значимым антибиотикам.

Ключевые слова: *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, антибиотикорезистентность, гены резистентности, ПЦР-диагностика, тест-системы

Благодарности: Работа выполнена в рамках проекта Российского научного фонда № 23-26-00053 «Разработка тест-систем для молекулярно-генетической диагностики клостридий с идентификацией токсинотипов и генов антибиотикорезистентности» в отделе геномных исследований и селекции животных на базе Уральского научно-исследовательского ветеринарного института – структурного подразделения ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН.

Для цитирования: Безбородова Н. А., Глотова Т. И., Соколова О. В., Шкуратова И. А., Зубарева В. Д., Мартынов Н. А., Романов Е. В., Готов А. Г. Разработка ПЦР-тест-систем для оценки распространённости генов антибиотикорезистентности у клостридий. *Ветеринария сегодня*. 2026; 15 (3): 280–289. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-280-289>

Конфликт интересов: Готов А. Г. является членом редколлегии журнала «Ветеринария сегодня» с 2020 г., но не имеет никакого отношения к решению опубликовать эту статью. Рукопись прошла принятию в журнале процедуру рецензирования. Об иных конфликтах интересов авторы не заявляли.

Для корреспонденции: Романов Егор Владимирович, младший научный сотрудник отдела ветеринарно-лабораторной диагностики с испытательной лабораторией ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, ул. Белинского, 112а, г. Екатеринбург, 620142, Россия, romanov.egor.2303@gmail.com

Development of PCR test systems for assessment of antibiotic resistance gene prevalence in *Clostridium* spp.

Natalia A. Bezborodova¹, Tatyana I. Glotova², Olga V. Sokolova¹, Irina A. Shkuratova¹, Vladlena D. Zubareva¹, Nikolai A. Martynov¹, Egor V. Romanov¹, Alexander G. Glotov²

¹ Ural Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Belinskogo, 112a, Ekaterinburg 620142, Russia

² Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East, Krasnoobsk 630501, Novosibirsk Oblast, Russia

ABSTRACT

Introduction. The rising prevalence of antibiotic resistance among pathogenic clostridia in the agro-industrial sector of the Ural Federal District highlights the need for this study. Emerging resistant strains compromise therapeutic outcomes, exacerbate economic losses attributable to infectious diseases, and pose a tangible threat of interspecies antimicrobial resistance gene transfer. These factors collectively necessitate the development of state-of-the-art molecular surveillance tools as a part of national antimicrobial resistance mitigation strategies.

Objective. The study was aimed at the development and testing of the PCR test systems for detection of antibiotic resistance genes (*tetM/B*, *ermB/Q*, *bcrA/B/D/R*) in *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile*.

Materials and methods. During the study 472 biological samples (animal feces, wound discharge, feed, environmental objects) collected on 32 dairy holdings located in the region in 2023–2024 were tested. The recovered isolates' species identity was confirmed by MALDI-ToF mass spectrometry, and the phenotypic antibiotic resistance was determined by disc diffusion method in accordance with EUCAST standards. Bank of DNAs extracted with PCR from submitted biological samples and *Clostridium* isolates, strains of various species of spore-forming anaerobes kept at the Microorganism Strain Collection was created.

Results. Effective PCR test-kit for the detection of antibiotic resistance genes in *Clostridia* spp. was successfully developed and validated. Screening of 123 samples containing DNA of the target pathogens revealed a high prevalence of resistance genes: *ermB* gene (95.1%) was most common in *Clostridium difficile*, *ermB* (90.0%) and *ermQ* (67.1%) genes were predominant in *Clostridium perfringens*. The *tetM* gene was detected in 52.4 and 60.0% of samples, respectively, while the *bcrA/B/D/R* genes were detected in 27.1–39.8% of isolates. Phenotypic studies confirmed the emergence of multidrug resistance in *Clostridia* spp.

Conclusion. The developed test kit has proven to be a reliable and robust tool for molecular antimicrobial resistance surveillance. The data obtained indicate a widespread circulation of *Clostridium* spp. harboring genetic determinants for resistance to clinically significant antibiotics.

Keywords: *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, antibiotic resistance, resistance genes, PCR diagnosis, test-kits

Acknowledgements: The work was carried out within the framework of the Russian Science Foundation Project No. 23-26-00053 "Development of test systems for the molecular genetic diagnosis of *Clostridium* spp. with the identification of toxin types and antibiotic resistance genes" at the Department of Genomic Research and Animal Breeding on the premises of the Ural Veterinary Research Institute, a structural unit of the Ural Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences.

For citation: Bezborodova N. A., Glotova T. I., Sokolova O. V., Shkuratova I. A., Zubareva V. D., Martynov N. A., Romanov E. V., Glotov A. G. Development of PCR test systems for assessment of antibiotic resistance gene prevalence in *Clostridium* spp. *Veterinary Science Today*. 2026; 15 (3): 280–289. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-280-289>

Conflict of interests: Glotov A. G. has been a member of the Editorial Board of the "Veterinary Science Today" journal since 2020, but was not involved in the decision-making process concerning the publication of this paper. The manuscript has passed the review procedure accepted in the journal. The authors did not declare any other conflicts of interests.

For correspondence: Egor V. Romanov, Junior Researcher, Department of Veterinary and Laboratory Diagnosis and Testing Laboratory, Ural Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Belinskogo, 112a, Ekaterinburg 620142, Russia, romanov.egor.2303@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Патогенные клостридии, вызывающие различные инфекционные заболевания у сельскохозяйственных животных, представляют серьезную ветеринарную и экономическую проблему для агропромышленного комплекса. Широкое распространение этих анаэробных спорообразующих микроорганизмов в окружающей среде, их способность к токсинообразованию и высокая патогенность обуславливают возникновение вспышек, ведущих к значительному падежу, особенно в условиях нарушения технологических и ветеринарно-санитарных норм [1, 2]. В структуре клостридиозов крупного рогатого скота наибольшую опасность представляют такие заболевания, как эмфизематозный карбункул (*Clostridium chauvoei*), злокачественный отек (*Cl. novyi* тип A, *Cl. septicum*, *Cl. sordellii*), а также анаэробные энтеротоксемии, вызываемые различными токсинотипами *Cl. perfringens* (A–E), столбняк (*Cl. tetani*), ботулизм (*Cl. botulinum*), некротизирующие энтериты, метриты и маститы (*Cl. perfringens* тип A) [3, 4].

В ходе многолетних исследований, охвативших 14 субъектов Российской Федерации (включая Московскую, Тюменскую, Рязанскую, Курскую, Иркутскую, Нижегородскую, Кировскую, Тверскую, Белгородскую,

Псковскую, Саратовскую, Самарскую, Челябинскую области и Республику Мордовию), установлено, что наиболее часто в биопробах выявляли *Cl. perfringens* и *Cl. difficile*. Другие патогенные виды клостридий, такие как *Cl. septicum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. bifermentans* и *Cl. butyricum*, регистрировали значительно реже. Эти данные согласуются с результатами мониторинга на территории Свердловской области, где в 2020–2024 гг. частота обнаружения геномов *Cl. difficile* и *Cl. perfringens* достигала 54,0–76,2% [5].

Критическим фактором, осложняющим борьбу с данными инфекциями в последние десятилетия, является рост резистентности к антимикробным препаратам у клостридий. Нерациональное применение антимикробных препаратов (АМП) в животноводстве привело к селекции резистентных штаммов бактерий, что существенно затрудняет лечение и повышает риск распространения устойчивости к антибиотикам [6]. Многочисленные зарубежные исследования выявляли у изолятов *Cl. perfringens* множественную лекарственную устойчивость к таким группам АМП, как тетрациклины, сульфаниламиды, макролиды и фторхинолоны, с обнаружением соответствующих детерминант резистентности (*tet*, *sul*, *erm* и др.) [7, 8]. Резистентность к таким препаратам, как ванкомицин

и метронидазол, отмечается также у других видов клостридий: *Cl. difficile* и *Cl. septicum* [4, 9, 10].

Несмотря на большое внимание в Российской Федерации к проблеме антибиотикорезистентности (в 2017 г. распоряжением Правительства РФ утверждена «Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года»¹, а в 2024 г. – план мероприятий на 2025–2030 гг. по ее реализации²), информации о выявлении устойчивости у анаэробных возбудителей болезней сельскохозяйственных животных в доступной литературе представлено недостаточно. Причина этого – трудоемкость классических бактериологических методов исследования. В то же время современные молекулярно-генетические подходы, в частности ПЦР-детекция генов устойчивости, позволяют проводить быстрый и целенаправленный анализ. Однако коммерческие ПЦР-тест-системы для выявления таких генов у видов клостридий, имеющих значение для ветеринарии, на отечественном рынке отсутствуют.

Таким образом, существует очевидная научно-практическая потребность в разработке эффективных инструментов для мониторинга антибиотикорезистентности у возбудителей клостридиозов. Своевременная идентификация патогена и определение его профиля резистентности являются ключевыми элементами для принятия обоснованных решений по терапии, контролю вспышек и обеспечению эпизоотического благополучия в животноводческих хозяйствах.

Целью данной работы являлась разработка, оптимизация и практическая апробация тест-системы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) для выявления генов антибиотикорезистентности (*tetM*, *tetB*, *ermB*, *ermQ*, *bcrA*, *bcrB*, *bcrD*, *bcrR*) у клостридий двух видов: *Cl. perfringens* и *Cl. difficile*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пробы биоматериала. В период с 2023 по 2024 г. исследовали методом ПЦР 472 пробы биологического материала, отобранного от животных из 32 молочно-товарных предприятий Уральского федерального округа. В 123 пробах обнаружены *Cl. perfringens* ($n = 103$) и *Cl. difficile* ($n = 70$), данные изоляты были исследованы на наличие генов резистентности.

Перечень поступивших на исследование образцов: сборные пробы фекалий от телят и коров, соскобы с раневых поверхностей коров, смывы из носовых ходов, цервико-вагинальные смывы, суставная жидкость, кусочки паренхиматозных органов, мышечной ткани и плаценты, гомогенат из паренхиматозных органов абортрованного плода, смывы с объектов окружающей среды и оборудования, подстилка, образцы с кормового стола коров, пробы корма и кормового сырья (сенаж, монокорм, кормосмесь, зерно кукурузы, пшеницы и ячменя, силос кукурузный, белковая добавка, клевер, люцерна), пробы почвы.

Работы с применением MALDI-ToF-масс-спектрометрии были выполнены в лаборатории ООО «Кволити Мед» (г. Екатеринбург). Всего этим методом исследовали 87 проб (фекалии от телят и коров,

соскобы раневого отделяемого, пробы кормов и кормового сырья, пробы почвы).

Отбор проб биоматериала проводили с использованием стандартных транспортных систем: для фекалий от животных применяли пробирки с транспортной средой CARY BLAIR (fecalSwab, COPAN, Италия), а для раневого отделяемого – пробирки с транспортной средой AMIES (ESwab, COPAN, Италия). Получали средние пробы кормов, кормового сырья и почвы и помещали их в стерильные полиэтиленовые пакеты для транспортировки и бактериологических исследований.

Штаммы бактерий. Коллекционные штаммы микроорганизмов: *Escherichia coli* ATCC 8739 (Microbiologics, США), *Clostridium perfringens* ATCC 13124 = CCUG 1795 = NCTC 8237, *Clostridium septicum* ATCC 12464 = CCUG 4855 = NCTC 547.

Питательные среды и растворы: основа колумбийского кровяного агара (Bio-Rad Laboratories, США), дефибрированная кровь барана (АО «ЭКОлаб», Россия), магниевая среда, висмут-сульфит агар, агар Плоскирева, ГРМ-агар (ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Россия), агар Сабуро с 2% глюкозы и хлорамфениколом (SIFIN Diagnostics, Германия), агар Мюллера – Хинтона (SIFIN Diagnostics, Германия), триптиказо-соевый бульон с 20%-м глицерином (Conda, Испания).

Коллекционные штаммы микроорганизмов: *Cl. perfringens* ATCC 13124 = CCUG 1795 = NCTC 8237, *Cl. septicum* ATCC 12464 = CCUG 4855 = NCTC 547.

Методы исследований. Бактериологические исследования проводили в соответствии с ГОСТ 26503-85 «Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики клостридиозов»³. Ферментативную активность у полученных изолятов определяли с использованием «Набора для идентификации анаэробных бактерий АНАЭРОтест 23» (Erba Mannheim, Чехия). Видовую идентификацию проводили с помощью MALDI-ToF-масс-спектрометрии на анализаторе Vitek MS (bioMérieux, Франция) [6]. Чувствительность к антимикробным препаратам определяли стандартным диско-диффузионным методом [9].

Полученные изоляты сохраняли на криосреде для пополнения банка ДНК и дальнейшей постановки ПЦР. В работе использовали дополнительно для измерения оптической плотности по McFarland прибор DensiChek (bioMérieux, Франция), прибор для приготовления питательных сред Masterclav09 (AES Chemunex, Франция), автоматический модуль для розлива в чашки APSOne (AES Chemunex, Франция), CO₂-инкубатор лабораторный 8000WJ (Thermo Scientific, США), инкубатор лабораторный Heratherm IMH60 (Thermo Scientific, Германия), автоматический анализатор антибиотикограмм ДДМ Adagio (Bio-Rad Laboratories, Франция).

Резистентность к антибиотикам определяли двумя параллельными методами [9, 10]. Исследование проводили на агаре Мюллера – Хинтона (Bio-Rad Laboratories, Франция) с использованием стандартных дисков, импрегнированных антибиотиками (Bio-Rad Laboratories, Франция). В работе применяли диски со следующими препаратами: амоксициллин / клавулановая кислота, гентамицин, левофлоксацин,

¹ <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71677266>

² <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/409448585>

³ <https://base.garant.ru/5916932>

Таблица 1
Перечень нуклеотидных последовательностей праймеров и меченых зондов

Table 1
List of nucleotide sequences of primers and labelled probes

Ген	Олигонуклеотидные последовательности (5'–3')	Размер ампликона (п. н.)	Референтная последовательность
<i>tetM</i>	Forward: TCATACTGTACTCCGCTCCC	82	NZ_CAEUHQ010000012.1
	Reverse: TCGAAGTCCACCGAATCCT		
	Probe: [FAM]TGGAAGCTGTGCTACAGATAGACCA[BHQ2]		
<i>tetB</i>	Forward: AGGTTTTGGAGCGTCAATAATG	100	NG_048319.1
	Reverse: AAGACCTTCGCTCTCCCT		
	Probe: [ROX]ATCCATTTTGGGCGACAGTAGGCTT[BHQ2]		
<i>ermB</i>	Forward: AAGGATTCTACAAGCGTACCT	80	CP118266.1 (20,833-21,570)
	Reverse: CAATGCTGAATCGAGACTTGA		
	Probe: [FAM]TTCACCGAAGACTAGGGTTGCTCTTG[BHQ1]		
<i>ermQ</i>	Forward: ATTTACTCTCTAGGTATCCC	80	NG_047835.1
	Reverse: AAATCACCAACTGATATGTGG		
	Probe: [ROX]TCTTTTGGCGAACCTTTCTCCATAACT[BHQ2]		
<i>bcrA</i>	Forward: CCACCTCCAATCAGTTTAGAAAAGT	111	LN835295.1:71678-72595
	Reverse: AAGTGTGGAGAAATCAATCGAGAA		
	Probe: [FAM]CATTATCCTTGTACGAGCAGTCCA[BHQ1]		
<i>bcrB</i>	Forward: CCACTAGTAAGCTATATCCCTCCAA	107	LN835295.1:70936-71637
	Reverse: GCTTCTTTGGATTGTATGCTAAC		
	Probe: [ROX]AAGACAGCGTCATATAGCCCAACAA[BHQ2]		
<i>bcrD</i>	Forward: ATGCTTCGCTCATATTAAGTGTGAT	95	LN835295.1:72776-73390
	Reverse: AATTGTTGAGGGTATTACTGAGTGG		
	Probe: [FAM]TCATATGCTCTGTGCTGCTGATAGGT[BHQ1]		
<i>bcrR</i>	Forward: GCTCCATGATTCTTTTCAAACAA	120	LN835295.1:72776-73390
	Reverse: CTTTCATTACAGACACTACCCCAA		
	Probe: [ROX]CAGTTTCGCTATCCCAAGTGCAATCA[BHQ2]		

норфлоксацин, ципрофлоксацин, цефепим, цефиксим, цефоперазон, цефотаксим, цефподоксим, цефтазидим, цефтриаксон и цефтиофур. Результаты антибиотикограммы (диаметры зон задержки роста) считывали автоматически с помощью анализатора Adagio (Bio-Rad Laboratories, Франция).

Сформирован банк ДНК, выделенной из поступивших проб биологического материала и изолятов клостридий (*Cl. perfringens*), коллекционных штаммов различных видов спорообразующих анаэробов: *Cl. perfringens* E № 413, *Cl. perfringens* D № 222, *Cl. perfringens* A № 307, *Cl. perfringens* № 213, *Cl. perfringens* C «Октябрь», *Cl. perfringens* C «Амо», *Cl. perfringens* B «LD4», *Cl. perfringens* E № 342, *Cl. perfringens* A (коллекция штаммов ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», Россия).

При разработке и оптимизации ПЦР-тест-систем для определения генов резистентности к антибиотикам у бактерий рода *Clostridium* использованы наиболее изученные и распространенные среди животных виды клостридий – *Cl. perfringens* и *Cl. difficile*.

На основании литературных данных были выбраны наиболее распространенные генетические детерминанты (*tetM/B*, *ermB/Q*, *bcrA/B/D/R*), отвечающие за резистентность к АМП у изолятов *Cl. perfringens* и *Cl. difficile* [11, 12, 13, 14, 15].

Проведен поиск референтных последовательностей генов антибиотикорезистентности с использованием баз данных National Center for Biotechnological Information (NCBI) и National Database of Antibiotic Resistant Organisms (NDARO). Подбор олигонуклеотидов производили с помощью Primer3 web [16] с учетом рекомендаций [17] (табл. 1).

Таблица 2
Синтезированные олигонуклеотидные последовательности положительных контрольных образцов

Table 2
Synthesized oligonucleotide sequences of positive controls

Ген	Олигонуклеотидные последовательности (5'–3')	Размер ампликона (п. н.)
<i>tetM</i>	TCATACTGACTCCGCTCCCTAATGGAAGCTGTGCTACAG ATAGACCAATGGAAGCCAGAAAGATTCTGGTGGAACTTCGA	82
<i>tetB</i>	AGGTTTTGGAGCGTCAATAATGCATATGCAGGAAGACTTA AATCCATTTTGGGCGACAGTAGGCTTAGAAATAGAACCAG CAGGGAGAGGCGAAGGTCTT	100
<i>ermB</i>	AAGGATTCTACAAGCGTACCTTGGATATTACCGAACACTA GGGTTGCTCTGCACACTCAAGTCTCGATTAGCAATTG	80
<i>ermQ</i>	ATTACTCTCTAGGTATCCATAAATCTTTTGCAGAACCT TTTCTCCATAACTAGCCACATATCAGTTGGTGAATTT	80
<i>bcrA</i>	CCACCTCCAATCAGTTTAGAAAAGTAGCTCTAAGTTTCCT CACTATCATTATCTTGTGACGAGCAGTTCGATTCGCAAAATT CTCGATTGATTTCTCCAACACTT	111
<i>bcrB</i>	CCACTAGTAAGCTATATCCCTCAATGTAAGACA GCGTCATATAGCCACAACGATAAATATACCTGC CCATGTTACAAGGTTAGCATAACAATCCAAGAAGC	107
<i>bcrD</i>	ATGCTTCGCTCATATTAAGGTGATAAATTCGTC CACAAGAATCATATGCTGCTGCTGATAGG TAGCCACTCAGTAATACCTCAACAATT	95
<i>bcrR</i>	GCTCCATGATTCCTTTTCAAACAACACACATC AGTTTCGCTATCCCAAGTGCAATCAAACAATAA AAACAATCCAATAGATTGCAAGATATATTGGGGT AGTGTCTGTAATGAAAG	120

Таблица 3
Программа амплификации с градиентом температур на этапе отжига праймеров

Table 3
Amplification program including a temperature gradient at the annealing stage

Стадия	Температура	Время	Цикл
Предварительная денатурация	95 °C	5 мин	1
Денатурация	95 °C	20 сек	40×
Отжиг праймеров	64–56 °C	20 сек	
Элонгация	72 °C	20 сек*	

* считывание уровня флуоресценции на этапе элонгации по соответствующему каналу (fluorescence signals are measured at the end of each elongation stage in the relevant fluorescence channel).

Полученные в ходе подбора праймеры были проверены на способность образовывать димеры в Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher Scientific, США).

Для валидации и оптимизации метода были синтезированы положительные контрольные образцы (табл. 2).

Для отработки праймерных систем использовали экстра-микс для ПЦР HS-taq (2×) (diaGene, Россия), реакционную смесь следующего состава: 12,5 мкл экстра-микса (2×) [100 мМ Трис-HCl, pH 8,5 (при 25 °C); 100 мМ KCl; 0,4 мМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата; 4 мМ MgCl₂; 0,06 ед. акт./мкл HS-Taq ДНК-

полимеразы; 0,2% Tween 20; стабилизаторы HS-Taq ДНК-полимеразы], 0,3 мМ каждого праймера и 0,3 мМ гидролизного зонда, 5 мкл исследуемого образца, H₂O дистиллированная до конечного объема 25 мкл. В качестве положительных контролей применяли синтезированные нуклеотиды, идентичные целевой последовательности генов антибиотикорезистентности.

Для определения оптимальных условий реакции проводили амплификацию с градиентом температур на этапе отжига праймеров (табл. 3) на приборе CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, США).

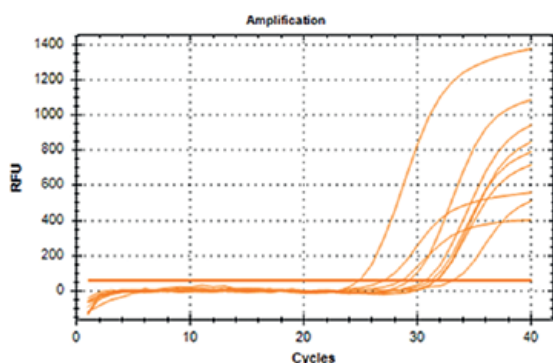


Рис. 1. График амплификации гена резистентности *tetB* у *Cl. perfringens*, *Cl. difficile* в ПЦР в реальном времени по каналу флуоресценции ROX

Fig. 1. Real-time PCR amplification curves of *tetB* resistance gene in *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* detected via the ROX fluorescence channel

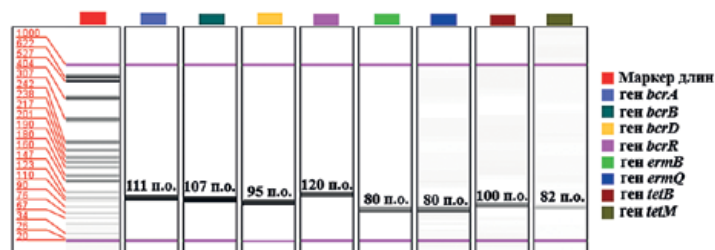


Рис. 2. Капиллярный электрофорез продуктов амплификации генов, отвечающих за резистентность к антибиотикам у *Cl. perfringens*, *Cl. difficile*

Fig. 2. Capillary electrophoresis analysis of PCR amplicons of antimicrobial resistance genes from *Cl. perfringens* and *Cl. difficile*

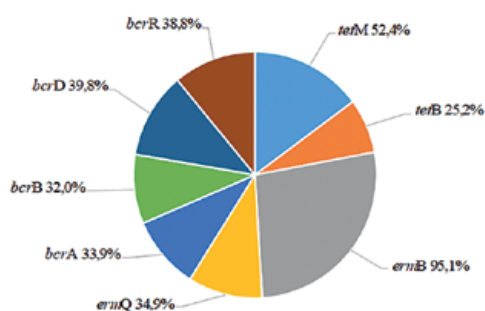


Рис. 3. Выявление генов резистентности к антибиотикам у изолятов *Cl. difficile* методом ПЦР (n = 103)

Fig. 3. Antibiotic resistance genes detected in *Cl. difficile* isolates with PCR (n = 103)

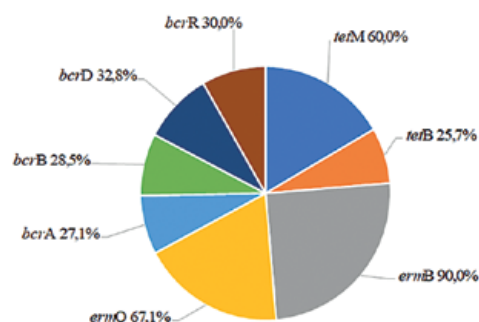


Рис. 4. Выявление генов резистентности к антибиотикам у изолятов *Cl. perfringens* методом ПЦР (n = 70)

Fig. 4. Antibiotic resistance genes detected in *Cl. perfringens* isolates with PCR (n = 70)

Специфичность праймеров дополнительно оценивали при помощи системы капиллярного электрофореза Qsep100 (BiOptic, Тайвань).

Выделение ДНК проводили с помощью набора Diatom DNA Prep 200 (ООО «ИзоГен», Россия). ПЦР-исследования для выявления ДНК клостридий в биологическом материале выполняли с использованием коммерческой тест-системы «РеалБест-Вет ДНК *Cl. difficile*/*Cl. perfringens*», а для типирования токсигенных штаммов – коммерческого набора «РеалБест-Вет ДНК *Cl. difficile* tcdA/tcdB/CDT» (АО «Вектор-Бест», Россия). Концентрацию полученных нуклеиновых кислот определяли флуориметрическим методом на приборе Qubit 4 (Invitrogen, США) с применением набора QuDye BR для количественного определения двухцепочечной ДНК в диапазоне от 2 до 1000 нг (Lumiprobe, Россия).

Дифференциацию между генами резистентности проводили за счет использования олигонуклеотидных гидролизных зондов и считывания результатов в процессе амплификации по каналам FAM и ROX. Валидацию анализа выполняли с применением ДНК выделенных из биологических проб изолятов *Cl. perfringens*, ДНК коллекционных штаммов и ДНК *Cl. difficile*, выде-

ленной из биологических проб с использованием коммерческого набора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе выполнения исследования были отработаны и адаптированы протоколы для идентификации генов резистентности. Установили, что подобранные нами праймеры инициируют амплификацию целевых участков генов *tetM* (82 п. н.), *tetB* (100 п. н.), *ermB*, *ermQ* (80 п. н.), *bcrA* (111 п. н.), *bcrB* (107 п. н.), *bcrD* (95 п. н.), *bcrR* (120 п. н.).

Получены графики амплификации на наличие генов резистентности *tetM*, *tetB* к тетрациклину, *ermB*, *ermQ* – к макролидам и *bcrA*, *bcrB*, *bcrD*, *bcrR* – к полипептидным антибиотикам у *Cl. perfringens* и *Cl. difficile*. Образцы считали положительными, если пороговое значение *Ct* по каналам FAM/ROX было ≤ 38 (рис. 1).

Специфичность разработанных праймеров для идентификации генов резистентности оценивали при помощи системы капиллярного электрофореза Qsep100 (рис. 2).

Результаты ПЦР по выявлению генов резистентности к антибиотикам у *Cl. difficile* и *Cl. perfringens* представлены на рисунках 3 и 4.

Из представленных данных видно, что *Cl. difficile* имеет широкий спектр генов антибиотикорезистентности. Наиболее часто, в 95,1% случаев, обнаруживался ген *ermB*, обуславливающий устойчивость к макролидам. Также к этому классу в 34,9% случаев относился ген *ermQ*. Были выявлены гены *tetM* (52,4%) и *tetB* (25,2%), отвечающие за устойчивость к тетрациклинам. Устойчивость к бацитрацину была ассоциирована с генами *bcrD* (39,8%), *bcrR* (38,8%), *bcrA* (33,9%) и *bcrB* (32,0%). Полученные данные о высокой распространенности и генетическом разнообразии механизмов устойчивости у данного патогена, в частности выявленные нами гены *ermB* и *tetM*, согласуются с результатами других исследований [12, 18, 19, 20].

Обнаружение генов *bcr* у значительной части изолятов *Cl. difficile* (32,0–39,8%) может быть обусловлено селективным давлением, создаваемым применением бацитрацина в лечебных целях при инфекционных заболеваниях у крупного рогатого скота, а также активными механизмами горизонтального переноса генетических детерминант устойчивости в популяциях патогена. Устойчивость *Cl. difficile* к бацитрацину опосредована несколькими генетическими механизмами. Прежде всего, это оперон *bcrRABD*, кодирующий ABC-транспортер и ундекапептидазу, синтез которой увеличивается при воздействии антибиотика [21]. Кроме того, важную роль играют двухкомпонентная регуляторная система *DraRS*, активирующая экспрессию локуса *hex*, необходимого для синтеза нового гликолипида и повышающего устойчивость к бацитрацину примерно в 4 раза [22], а также протеаза *PrsW*, регулирующая активность внецитоплазматических σ -факторов в ответ на воздействие бацитрацина [23]. Высокая частота детекции генов *bcr* в исследованных изолятах может быть объяснена их локализацией на мобильных генетических элементах, что обеспечивает их эффективное распространение в популяциях *Cl. difficile* посредством горизонтального переноса [21].

У изолятов *Cl. perfringens* также выявлены гены резистентности к макролидам: *ermB* был обнаружен в 90,0% случаев, а *ermQ* – в 67,1%. Наиболее распространенным геном, опосредующим устойчивость к тетрациклинам, оказался *tetM* (60,0%), тогда как *tetB* выявлялся реже – в 25,7% проб. Гены, ассоциированные с устойчивостью к бацитрацину, также присутствовали: *bcrD* (32,8%), *bcrR* (30,0%), *bcrB* (28,5%), *bcrA* (27,1%).

Проведенный скрининг на наличие генов резистентности у коллекционных штаммов показал присутствие у штаммов *Cl. perfringens* С «Амо» и *Cl. perfringens* Е № 342 гена *bcrR*, отвечающего за устойчивость к бацитрацину – полипептидному антибиотику, синтезируемому штаммами бактерии *Bacillus subtilis*. У одного изолята *Cl. perfringens* типа А, полученного из проб фекалий от телят, был обнаружен ген *ermB*, обуславливающий резистентность к эритромицину.

Изоляты *Cl. perfringens* были фенотипически устойчивы к антибиотикам группы фторхинолонов (ципрофлоксацин, марбофлоксацин, норфлоксацин, энрофлоксацин, левофлоксацин), аминогликозидов (гентамицин) и пенициллинов (амоксиклав). Генотипическая характеристика показала, что гены устойчивости к эритромицину из группы макролидов присутствовали у изолятов по отдельности или в комбинации.

Полученные данные о распространении генов антибиотикорезистентности у *Cl. perfringens* согласу-

ются с результатами других авторов. Частота детекции генов *ermB* и *tetB* у изолятов *Cl. perfringens* в наших исследованиях соответствует показателям, полученным зарубежными авторами [12, 15, 21, 22, 23, 24], а уровень выявления гена *tetB* (25–26%) близок к данным, представленным V. Adams et al. [11]. Также ранее в наших научных работах [4, 5] уже была описана устойчивость к бацитрацину, обусловленная генами *bcr*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполненной работы разработана и апробирована тест-система на основе ПЦР для выявления генов антибиотикорезистентности у клостридий. На основании анализа 472 проб биологического материала от животных с молочно-товарных предприятий Уральского федерального округа отработаны и валидированы протоколы для одновременного выявления восьми ключевых генетических детерминант (*tetM*, *tetB*, *ermB*, *ermQ*, *bcrA*, *bcrB*, *bcrD*, *bcrR*), ответственных за устойчивость к тетрациклинам, макролидам и бацитрацину.

Разработанная тест-система позволила выявить высокую распространенность этих генов у изолятов *Cl. perfringens* ($n = 103$) и *Cl. difficile* ($n = 70$). Критическими являются показатели устойчивости к макролидам; ген *ermB* у *Cl. difficile* обнаружен в 95,1% случаев, у *Cl. perfringens* – в 90,0% случаев. Значительная частота встречаемости отмечена для генов резистентности к тетрациклинам: у *Cl. difficile* (*tetM* до 52,4%) и *Cl. perfringens* (*tetM* до 60,0%); к бацитрацину: у *Cl. difficile* (*bcrD* до 39,8%) и *Cl. perfringens* (*bcrD* до 32,8%). Результаты выявления генов резистентности свидетельствуют о формировании у клостридий, циркулирующих у животных, лекарственной устойчивости к антибиотикам разных групп.

Таким образом, в ходе работы на основе ПЦР разработана тест-система для мониторинга резистентности к антибиотикам и получены данные, свидетельствующие о распространении резистентных видов клостридий в животноводческих хозяйствах региона. Разработанная тест-система может быть использована для совершенствования мер системного контроля распространения клостридиозов среди крупного рогатого скота и рационального применения антимикробных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Судоргина Т. Е., Глотова Т. И., Нефедченко А. В., Котенева С. В., Велькер Д. А., Глов А. Г. Частота выделения бактерий *Clostridium* spp. и их ассоциаций при различных формах клостридиоза крупного рогатого скота. *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*. 2024; 54 (3): 55–62. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2024-3-6>
2. Нефедченко А. В., Глотова Т. И., Судоргина Т. Е. Видовой состав и токсигенные свойства клостридий крупного рогатого скота в Западно-Сибирском регионе и разработка тест-системы для их выявления. *Инновационные достижения ветеринарной науки и практики: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 85-летию доктора ветеринарных наук, профессора, заслуженного деятеля науки Российской Федерации Тарнуева Юрия Абоговича (Улан-Удэ, 14–16 июля 2024 г.)*. Улан-Удэ: Бурятская ГСХА им. В. Р. Филиппова; 2024; 145–151. <https://elibrary.ru/yvltlw>
3. Нефедченко А. В., Судоргина Т. Е., Глотова Т. И., Котенева С. В., Глов А. Г. Видовая идентификация бактерий рода *Clostridium*, выделенных от крупного рогатого скота, при помощи мультиплексной ПЦР в режиме реального времени. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*. 2025; 17 (2): 315–333. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2025-17-2-1178>
4. Безбородова Н. А., Соколова О. В., Кожуховская В. В., Томских О. Г., Печура Е. В., Суздальцева М. А. Патогенные виды клостридий и их устойчивость к антибиотикам, факторы вирулентности и геномные

особенности. *Инновации и продовольственная безопасность*. 2023; (3): 39–51. <https://doi.org/10.31677/2311-0651-2023-41-3-39-51>

5. Безбородова Н. А., Порываева А. П., Шилова Е. Н., Кожуховская В. В., Соколова О. В., Яценюк С. П. Оценка эффективности вакцин против клостридиозов крупного рогатого скота, с учетом доминирующих анаэробных возбудителей на территории Свердловской области. *Ветеринария Кубани*. 2025; (1): 4–7. <https://elibrary.ru/jugmez>

6. Андреева С. В., Шадрова Н. Б., Скитович Г. С. Методические рекомендации по идентификации микроорганизмов с применением масс-спектрометра MALDI-ToF Autof MS 1000: утв. ФГБУ «ВНИИЗЖ» 23.06.2023 № 44-23. Владимир; 2023. 43 с.

7. Bendary M. M., Abd El-Hamid M. I., El-Tarabili R. M., Hefny A. A., Algendy R. M., Elzohairy N. A., et al. *Clostridium perfringens* associated with foodborne infections of animal origins: insights into prevalence, antimicrobial resistance, toxin genes profiles, and toxinotypes. *Biology*. 2022; 11 (4):551. <https://doi.org/10.3390/biology11040551>

8. Hassani S., Pakbin B., Brück W. M., Mahmoudi R., Mousavi S. Prevalence, antibiotic resistance, toxin-typing and genotyping of *Clostridium perfringens* in raw beef meats obtained from Qazvin City, Iran. *Antibiotics*. 2022; 11 (3):340. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030340>

9. МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: методические указания. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России; 2004. 91 с.

10. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0. 2020. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf

11. Adams V., Han X., Lyras D., Rood J. I. Antibiotic resistance plasmids and mobile genetic elements of *Clostridium perfringens*. *Plasmid*. 2018; 99: 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.07.002>

12. Anju K., Karthik K., Divya V., Mala Priyadarshini M. L., Sharma R. K., Manoharan S. Toxinotyping and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Clostridium perfringens* isolated from different sources of livestock and poultry. *Anaerobe*. 2021; 67:102298. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102298>

13. Holt H. M., Danielsen T. K., Justesen U. S. Routine disc diffusion antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* and association with PCR ribotype 027. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2015; 34 (11): 2243–2246. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2475-x>

14. Huang H., Weintraub A., Fang H., Wu S., Zhang Y., Nord C. E. Antimicrobial susceptibility and heteroresistance in Chinese *Clostridium difficile* strains. *Anaerobe*. 2010; 16 (6): 633–635. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.09.002>

15. Imwattana K., Rodríguez C., Riley T. V., Knight D. R. A species-wide genetic atlas of antimicrobial resistance in *Clostridioides difficile*. *Microbial Genomics*. 2021; 7 (11):000696. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000696>

16. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B. C., Remm M., Rozen S. G. Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. 2012; 40 (15):e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>

17. Rodríguez A., Rodríguez M., Córdoba J. J., Andrade M. J. Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. In: *PCR Primer Design. Methods in Molecular Biology*. Vol. 1275. Ed. by C. Basu. New York: Humana Press; 2015; Chapter 3: 31–56. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_3

18. Schmidt K., Löffler B., Ackermann G. Antimicrobial phenotypes and molecular basis in clinical strains of *Clostridium difficile*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2007; 59 (1): 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.03.009>

19. Spigaglia P., Mastrantonio P. Comparative analysis of *Clostridium difficile* clinical isolates belonging to different genetic lineages and time periods. *Journal of Medical Microbiology*. 2004; 53 (11): 1129–1136. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45682-0>

20. Bendary M. M., Abd El-Hamid M. I., El-Tarabili R. M., Hefny A. A., Algendy R. M., Elzohairy N. A., et al. *Clostridium perfringens* associated with foodborne infections of animal origins: insights into prevalence, antimicrobial resistance, toxin genes profiles, and toxinotypes. *Biology*. 2022; 11 (4):551. <https://doi.org/10.3390/biology11040551>

21. Kartalidis P., Skoulakis A., Tsilipounidaki K., Florou Z., Petinaki E., Fthenakis G. C. *Clostridioides difficile* as a dynamic vehicle for the dissemination of antimicrobial-resistance determinants: review and in silico analysis. *Microorganisms*. 2021; 9 (7):1383. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071383>

22. Pannullo A. G., Zbylicki B. R., Ellermeier C. D. Identification of DraRS in *Clostridioides difficile*, a two-component regulatory system that responds to lipid II-interacting antibiotics. *Journal of Bacteriology*. 2023; 205 (10):e00164-23. <https://doi.org/10.1128/jb.00164-23>

23. Ho T. D., Ellermeier C. D. PrsW is required for colonization, resistance to antimicrobial peptides, and expression of extracytoplasmic function

o factors in *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity*. 2011; 79 (8): 3229–3238. <https://doi.org/10.1128/iai.00019-11>

24. Kather E. J., Marks S. L., Foley J. E. Determination of the prevalence of antimicrobial resistance genes in canine *Clostridium perfringens* isolates. *Veterinary Microbiology*. 2006; 113 (1–2): 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.10.021>

REFERENCES

1. Sudorgina T. E., Glotova T. I., Nefedchenko A. V., Koteneva S. V., Velker D. A., Glotov A. G. The frequency of bacterial isolation of *Clostridium* spp. and their associations in various forms of clostridiosis in cattle. *Siberian Herald of Agricultural Science*. 2024; 54 (3): 55–62. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2024-3-6> (in Russ.)

2. Nefedchenko A. V., Glotova T. I., Sudorgina T. E. Species composition and toxigenic properties of clostridium in cattle in the West Siberian region and development of a test system for their detection. *Innovatsionnye dostizheniya veterinarnoi nauki i praktiki: materialy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi 85-letiyu doktora veterinarnykh nauk, professora, zaslužennogo deyatelya nauki Rossiiskoi Federatsii Tarnueva Yuriya Abogovovicha (Ulan-Ude, 14–16 iyulya 2024 g.) = Innovations in Veterinary Science and Practice: proceedings of the International Scientific and Practical Conference devoted to the 85th anniversary of Yuriy Abogovovich Tarnuev, Professor, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Honored Scientist of the Russian Federation (Ulan-Ude, July 14–16, 2024)*. Ulan-Ude: V. R. Filippov Buryat State Agricultural Academy. 2024; 145–151. <https://elibrary.ru/yvltlw> (in Russ.)

3. Nefedchenko A. V., Sudorgina T. E., Glotova T. I., Koteneva S. V., Glotov A. G. Species identification of bacteria of the genus *Clostridium* isolated from cattle by multiplex real-time PCR. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*. 2025; 17 (2): 315–333. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2025-17-2-1178> (in Russ.)

4. Bezborodova N. A., Sokolova O. V., Kozhukhovskaya V. V., Tomsikh O. G., Pechura E. V., Suzdal'tseva M. A. Pathogenic species of *Clostridia* and their antibiotic resistance, virulence factors, and genomic features. *Innovations and Food Safety*. 2023; (3): 39–51. <https://doi.org/10.31677/2311-0651-2023-41-3-39-51> (in Russ.)

5. Bezborodova N. A., Poryvaeva A. P., Shilova E. N., Kozhukhovskaya V. V., Sokolova O. V., Yatsentyuk S. P. Evaluation of the efficiency of vaccines against bovine clostridiosis, taking into account the dominant anaerobic pathogens in Sverdlovsk region. *Veterinaria Kubani*. 2025; (1): 4–7. <https://elibrary.ru/jugmez> (in Russ.)

6. Андреева С. В., Шадрова Н. Б., Скитович Г. С. Methodical guidelines for microorganism identification with MALDI-ToF Autof MS 1000 mass spectrometer: approved by the Federal Centre for Animal Health, on 23 June 2023 No. 44-23. Vladimir; 2023. 43 p. (in Russ.)

7. Bendary M. M., Abd El-Hamid M. I., El-Tarabili R. M., Hefny A. A., Algendy R. M., Elzohairy N. A., et al. *Clostridium perfringens* associated with foodborne infections of animal origins: insights into prevalence, antimicrobial resistance, toxin genes profiles, and toxinotypes. *Biology*. 2022; 11 (4):551. <https://doi.org/10.3390/biology11040551>

8. Hassani S., Pakbin B., Brück W. M., Mahmoudi R., Mousavi S. Prevalence, antibiotic resistance, toxin-typing and genotyping of *Clostridium perfringens* in raw beef meats obtained from Qazvin City, Iran. *Antibiotics*. 2022; 11 (3):340. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030340>

9. MG 4.2.1890-04 Testing of microorganisms for susceptibility to antimicrobials: methodical guidelines. Moscow: Federal Center for State Sanitary and Epidemiological Surveillance (Russian Ministry of Health); 2004. 91 p. (in Russ.)

10. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0. 2020. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf

11. Adams V., Han X., Lyras D., Rood J. I. Antibiotic resistance plasmids and mobile genetic elements of *Clostridium perfringens*. *Plasmid*. 2018; 99: 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.07.002>

12. Anju K., Karthik K., Divya V., Mala Priyadarshini M. L., Sharma R. K., Manoharan S. Toxinotyping and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Clostridium perfringens* isolated from different sources of livestock and poultry. *Anaerobe*. 2021; 67:102298. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102298>

13. Holt H. M., Danielsen T. K., Justesen U. S. Routine disc diffusion antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* and association with PCR ribotype 027. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2015; 34 (11): 2243–2246. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2475-x>

14. Huang H., Weintraub A., Fang H., Wu S., Zhang Y., Nord C. E. Antimicrobial susceptibility and heteroresistance in Chinese *Clostridium difficile* strains. *Anaerobe*. 2010; 16 (6): 633–635. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.09.002>

15. Imwattana K., Rodríguez C., Riley T. V., Knight D. R. A species-wide genetic atlas of antimicrobial resistance in *Clostridioides difficile*. *Microbial Genomics*. 2021; 7 (11):000696. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000696>
16. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B. C., Remm M., Rozen S. G. Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. 2012; 40 (15):e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
17. Rodríguez A., Rodríguez M., Córdoba J. J., Andrade M. J. Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. In: *PCR Primer Design. Methods in Molecular Biology Methods in Molecular Biology*. Vol. 1275. Ed. by C. Basu. New York: Humana Press; 2015; Chapter 3: 31–56. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_3
18. Schmidt C., Löffler B., Ackermann G. Antimicrobial phenotypes and molecular basis in clinical strains of *Clostridium difficile*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2007; 59 (1): 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.03.009>
19. Spigaglia P., Mastrantonio P. Comparative analysis of *Clostridium difficile* clinical isolates belonging to different genetic lineages and time periods. *Journal of Medical Microbiology*. 2004; 53 (11): 1129–1136. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45682-0>
20. Bendary M. M., Abd El-Hamid M. I., El-Tarabili R. M., Hefny A. A., Algendy R. M., Elzohairy N. A., et al. *Clostridium perfringens* associated with foodborne infections of animal origins: insights into prevalence, antimicrobial resistance, toxin genes profiles, and toxinotypes. *Biology*. 2022; 11 (4):551. <https://doi.org/10.3390/biology11040551>
21. Kartalidis P., Skoulakis A., Tsilipounidaki K., Florou Z., Petinaki E., Fthenakis G. C. *Clostridioides difficile* as a dynamic vehicle for the dissemination of antimicrobial-resistance determinants: review and in silico analysis. *Microorganisms*. 2021; 9 (7):1383. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071383>
22. Pannullo A. G., Zbylicki B. R., Ellermeier C. D. Identification of DraRS in *Clostridioides difficile*, a two-component regulatory system that responds to lipid II-interacting antibiotics. *Journal of Bacteriology*. 2023; 205 (10):e00164-23. <https://doi.org/10.1128/jb.00164-23>
23. Ho T. D., Ellermeier C. D. PrsW is required for colonization, resistance to antimicrobial peptides, and expression of extracytoplasmic function σ factors in *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity*. 2011; 79 (8): 3229–3238. <https://doi.org/10.1128/iai.00019-11>
24. Kather E. J., Marks S. L., Foley J. E. Determination of the prevalence of antimicrobial resistance genes in canine *Clostridium perfringens* isolates. *Veterinary Microbiology*. 2006; 113 (1–2): 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.10.021>

Поступила в редакцию / Received 07.04.2026

Поступила после рецензирования / Revised 19.06.2026

Принята к публикации / Accepted 10.07.2026

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Безбородова Наталья Александровна, канд. вет. наук, старший научный сотрудник отдела геномных исследований и селекции животных ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-2793-5001>, n-bezborodova@mail.ru

Глотова Татьяна Ивановна, д-р биол. наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории биотехнологии – диагностического центра ИЭВСиДВ СФНЦА РАН, пос. Краснообск, Новосибирская обл., Россия; <https://orcid.org/0000-0003-3538-8749>, t-glotova@mail.ru

Соколова Ольга Васильевна, д-р вет. наук, ведущий научный сотрудник отдела геномных исследований и селекции животных, руководитель Уральского научно-исследовательского ветеринарного института – структурного подразделения ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-1169-4090>, nauka_sokolova@mail.ru

Шкуратова Ирина Алексеевна, д-р вет. наук, профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник отдела экологии и незаразной патологии животных ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-0025-3545>, shkuratova@bk.ru

Зубарева Владлена Дмитриевна, младший научный сотрудник отдела геномных исследований и селекции животных ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-0284-0276>, zzub97@mail.ru

Мартынов Николай Александрович, лаборант отдела геномных исследований и селекции животных ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-9251-0056>, martynov_kolya98@mail.ru

Natalia A. Bezborodova, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Department of Animal Genomics and Selection, Ural Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-2793-5001>, n-bezborodova@mail.ru

Tatyana I. Glotova, Dr. Sci. (Biology), Professor, Chief Researcher, Laboratory of Biotechnology – Diagnostic Center, Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East, Krasnoobsk, Novosibirsk Oblast, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-3538-8749>, t-glotova@mail.ru

Olga V. Sokolova, Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Department of Animal Genomics and Selection, Head of Ural Scientific Research Veterinary Institute, Ural Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-1169-4090>, nauka_sokolova@mail.ru

Irina A. Shkuratova, Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Chief Researcher, Department of Ecology and Animals' Noncontagious Pathology, Ural Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-0025-3545>, shkuratova@bk.ru

Vladlena D. Zubareva, Junior Researcher, Department of Animal Genomics and Selection, Ural Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-0284-0276>, zzub97@mail.ru

Nikolai A. Martynov, Laboratory Assistant, Department of Animal Genomics and Selection, Ural Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-9251-0056>, martynov_kolya98@mail.ru

Романов Егор Владимирович, младший научный сотрудник отдела ветеринарно-лабораторной диагностики с испытательной лабораторией ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия; <https://orcid.org/0009-0006-4980-0481>, romanov.egor.2303@gmail.com

Egor V. Romanov, Junior Researcher, Department of Veterinary and Laboratory Diagnosis and Testing Laboratory, Ural Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia; <https://orcid.org/0009-0006-4980-0481>, romanov.egor.2303@gmail.com

Глотов Александр Гаврилович, д-р вет. наук, профессор, член-корреспондент РАН, руководитель ИЭВСиДВ СФНЦА РАН, пос. Краснообск, Новосибирская обл., Россия; <https://orcid.org/0000-0002-2006-0196>, glotov_vet@mail.ru

Alexander G. Glotov, Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Corresponding Member of the RAS, Head of the Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East, Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk Oblast, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-2006-0196>, glotov_vet@mail.ru

Вклад авторов: Безбородова Н. А. – администрирование, дизайн исследования, отбор проб, лабораторные исследования, подготовка и редактирование текста; Глотова Т. И. – администрирование, подготовка и редактирование текста; Соколова О. В. – дизайн исследования, подготовка и редактирование текста; Шкуратова И. А. – подготовка и редактирование текста; Зубарева В. Д. – отбор проб, лабораторные исследования, работа с литературой, редактирование текста; Мартынов Н. А. – дизайн опытов, лабораторные исследования, обработка данных; Романов Е. В. – лабораторные исследования, работа с литературой, редактирование текста; Глотов А. Г. – работа с литературой, редактирование текста.

Contribution of the authors: Bezborodova N. A. – managing, study design, sampling, laboratory tests, paper text preparation and editing; Glotova T. I. – managing, paper text preparation and editing; Sokolova O. V. – study design, paper text preparation and editing; Shkuratova I. A. – paper text preparation and editing; Zubareva V. D. – sampling, laboratory tests, literature searching and reviewing; Martynov N. A. – test design, laboratory tests, test data processing; Romanov E. V. – laboratory tests, literature searching and reviewing, paper text editing; Glotov A. G. – literature searching and reviewing, paper text editing.



<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-290-295>
УДК 619:579:616.596:636.22/.28



Микробная этиология язвенных болезней копытного рога крупного рогатого скота

А. С. Метлева, Д. Д. Нагибина, В. Ю. Филатов

ФГБОУ ВО «Кузбасский государственный аграрный университет имени В. Н. Полецкого» (Кузбасский ГАУ), ул. Марковцева, 5, г. Кемерово, 650056, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Болезни копытного рога крупного рогатого скота с язвенными поражениями мягких тканей, в том числе пальцевой дерматит, — распространенная группа заболеваний во всем мире. Предрасполагающими факторами к их возникновению являются механические травмы, позволяющие микроорганизмам проникать в мягкие ткани и вызывать гнойно-язвенные поражения, осложненные некрозом. Эти патологии имеют полимикробную причину, но среди возбудителей можно выделить несколько патогенетических групп: иницирующие болезни; осложняющие их течение; вторичные. Основной причиной развития инфекционных заболеваний являются анаэробные микроорганизмы *Fusobacterium* spp. и *Clostridium* spp.

Цель исследования. Установление этиологической причины возникновения язвенных болезней копыт крупного рогатого скота.

Материалы и методы. При проведении исследований применяли микробиологические методы. Животные с язвенными поражениями копытного рога были разделены на две группы: с лечением и без лечения (свежевыявленные случаи болезней).

Результаты. Установлено, что контаминантами при язвенных поражениях копыт у крупного рогатого скота являются: *Fusobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*. Возбудители рода *Fusobacterium* spp. играют основную роль в развитии заболеваний. Представителей рода *Clostridium* spp. изолируют из глубоких поражений, обеспечивающих им анаэробные условия развития.

Заключение. Основными контаминантами при язвенных поражениях копыт у крупного рогатого скота являются микроорганизмы рода *Fusobacterium* spp. (100%-я встречаемость), *Clostridium* spp. (80%), *Klebsiella pneumoniae* (90%).

Ключевые слова: болезни копыт, крупный рогатый скот, этиология, микроорганизмы

Благодарности: Работа выполнена при финансовой поддержке ФГБУ «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» (Фонд содействия инновациям).

Для цитирования: Метлева А. С., Нагибина Д. Д., Филатов В. Ю. Микробная этиология язвенных болезней копытного рога крупного рогатого скота. *Ветеринария сегодня*. 2026; 15 (3): 290–295. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-290-295>

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Метлева Анастасия Сергеевна, канд. вет. наук, доцент кафедры ветеринарной медицины и биотехнологий, заведующий лабораторией биохимических, молекулярно-генетических исследований и селекции сельскохозяйственных животных, Кузбасский ГАУ, ул. Марковцева, 5, г. Кемерово, 650056, Россия, zveryiski@mail.ru

Microbial etiology of ulcerative hoof disease in cattle

Anastasiya S. Metleva, Darya D. Nagibina, Vyacheslav Yu. Filatov

Kuzbass State Agrarian University named after V. N. Poletskov, ul. Markovtseva, 5, Kemerovo 650056, Russia

ABSTRACT

Introduction. Ulcerative diseases of the bovine hoof and adjacent soft tissues — including digital dermatitis — are widespread globally. Mechanical trauma predisposes these tissues to microbial invasion, triggering purulent-ulcerative lesions that frequently progress to tissue necrosis. These conditions are typically polymicrobial in nature. However, the associated microorganisms can be classified into three pathogenetic groups: primary, complicating and secondary pathogens. Anaerobic bacteria, particularly *Fusobacterium* spp. and *Clostridium* spp., play a significant role in the development of infectious hoof diseases in cattle.

Objective. Determination of the etiological cause of ulcerative hoof diseases in cattle.

Materials and methods. Microbiological methods were used for the study. Animals with ulcerative hoof lesions were divided into two groups: animals receiving treatment and animals without treatment (newly diagnosed cases).

Results. Detected contaminants associated with ulcerative hoof lesions in cattle included: *Fusobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Klebsiella pneumoniae* and *Enterococcus faecalis*. *Fusobacterium* spp. played a major role in the disease progression. *Clostridium* spp. were isolated from deep lesions, creating anaerobic environment required for their development.

Conclusion. The predominant microorganisms isolated from ulcerative hoof lesions in cattle were *Fusobacterium* spp., detected in 100% of samples, followed by *Klebsiella pneumoniae* (90%) and *Clostridium* spp. (80%).

Keywords: hoof diseases, cattle, etiology, microorganisms

Acknowledgements: The study was financially supported by the Federal State Budgetary Institution “Foundation for Assistance to Small Innovative Establishments” (Innovation Assistance Fund).

For citation: Metleva A. S., Nagibina D. D., Filatov V. Yu. Microbial etiology of ulcerative hoof disease in cattle. *Veterinary Science Today*. 2026; 15 (3): 290–295. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-290-295>

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

For correspondence: Anastasiya S. Metleva, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Associate Professor, Department of Veterinary Medicine and Biotechnology, Head of the Laboratory of Biochemical, Molecular Genetic Research and Breeding of Farm Animals, Kuzbass State Agrarian University named after V. N. Poletskov, ul. Markovtseva, 5, Kemerovo 650056, Russia, zveryski@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Язвенные болезни копытного рога у крупного рогатого скота – серьезная проблема промышленного молочного скотоводства во всем мире: в Великобритании заболеваемость составляет 30,9%; в США – от 13 до 70%; в Бразилии – 78% (в сезон дождей) и 44% (в сухой сезон), так как данная группа патологий зависит от времени года. Из них около 80–90% причин хромоты у животных связаны с патологиями в области пальцев, что, скорее всего, обусловлено большой нагрузкой на эту область. В подавляющем большинстве случаев (около 75–85%) хромота поражает тазовые конечности крупного рогатого скота.

Среди язвенных болезней копытного рога наиболее часто встречается пальцевой дерматит. Это разное заболевание, поражающее дистальный отдел конечностей крупного рогатого скота, которое обычно приводит к клинически явной хромоте и снижению репродуктивных качеств животных. Пальцевой дерматит, нередко переходящий в некроз, сопровождается характерным неприятным запахом. Встречается в 12,4% случаев среди воспалительных болезней копытного рога [1]. Другие болезни конечностей, такие как хронический ламинит, язвенный пододерматит и межпальцевая гиперплазия, регистрируются в 7,4–9,8% случаев [2].

Экономические убытки при болезнях копыт складываются из трех основных составляющих: потери в производстве молока – около 40%; затраты, вызванные нарушениями фертильности, – около 30%; расходы на лечение – приблизительно 30%, так как болезни копыт развиваются за несколько недель или даже месяцев до постановки диагноза и длятся несколько недель, а в некоторых случаях и несколько месяцев после завершения лечения. Поэтому своевременное выявление и лечение язвенных болезней копыт – основополагающий фактор успешного и быстрого выздоровления животных, способствующий снижению распространенности случаев хромоты в молочных стадах [3, 4].

Несмотря на распространенность язвенных болезней копыт, они остаются патологией неизвестной этиологии и эпидемиологии, а отсутствие золотого стандарта для диагностики затрудняет своевременное обнаружение болезни [5], так как до сих пор не существует единого мнения относительно причин возникновения и патогенеза этих заболеваний [6, 7].

Этиопатогенез пальцевого дерматита у крупного рогатого скота многофакторен. Предрасполагающими факторами являются условия содержания животных (размеры помещения, плотность размещения скота, состояние поверхностей для ходьбы и отдыха). Но большинство случаев заболеваний пальцевым

дерматитом связано с инфекционным началом, следовательно, большое значение в сдерживании распространения этих болезней играет чистота окружающей среды и стерильность инструментов, которыми обрабатывается копытный рог, в том числе лезвия для обрезания копыт [8]. Авторы придерживаются мнения, что пальцевой дерматит – это полиэтиологическая группа заболеваний, включающая бактерии родов *Fusobacterium* spp., в том числе *Fusobacterium necrophorum*, *Porphyromonas* spp., *Mycoplasma* spp., *Campylobacter* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Peptococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., а также аэробные бактерии, такие как *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., в том числе *Streptococcus dysgalactiae*, *Treponema* spp. и *Trueperella pyogenes*. Спирохеты являются самой распространенной бактериальной причиной пальцевого дерматита [3, 6, 9, 10, 11]. Однако точное значение этих видов бактерий в развитии воспаления до конца не изучено [7]. Полимикробную причину болезней копыт подтверждают V. Bay et al., утверждающие, что данную группу патологий нельзя связывать с отдельными таксонами [12].

Наиболее значимыми представителями микрофлоры, вызывающими поражения поверхностных и глубоких зон, являются бактерии рода *Treponema* spp., доминирующие в глубоких слоях эпидермиса. Виды *Campylobacter* spp., *Fusobacterium* spp., *Porphyromonas* spp. и *Bacteroides* spp. проникают в поврежденную эпителиальную ткань и являются иницирующей причиной воспаления на ранних стадиях развития болезни. Также с пальцевым дерматитом ассоциируют виды *Guggenheimella* spp. и *Dichelobacter nodosus*, способные глубоко проникать в мягкие ткани, при этом не обнаруживаясь в поверхностной бактериальной биопленке, покрывающей поражения мягких тканей. *Dichelobacter nodosus* в сочетании с *Fusobacterium necrophorum* и трепонемами вызывает межпальцевой дерматит [1, 13, 14].

Учитывая полиэтиологичность пальцевого дерматита, существует необходимость в определении основного патогена, а также предрасполагающих к дальнейшему развитию болезни видов микроорганизмов вторичной и сопутствующей микрофлоры.

Цель исследования – установить этиологическую причину возникновения язвенных болезней копыт крупного рогатого скота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования являлись смывы с язвенной поверхности ран на копытном роге крупного рогатого скота. Морфологические и ростовые свойства изолятов бактерий изучали бактериологическими методами.



Рис. 1. Заболевания копыт у животных, включенных в исследование

Fig. 1. Hoof diseases in animals included in the study

Отбор проб (10 шт.) производили стерильным тупфером, смоченным в стерильном физиологическом растворе. Образцы поражения были собраны путем вращения стерильного аппликатора с хлопковым наконечником на поверхности поражения на 360°. В лабораторию пробы доставляли в термоконтейнерах.

Бактериологический анализ. Культивирование и идентификацию анаэробов осуществляли в соответствии с «Методическими указаниями по лабораторной диагностике некробактериоза» (утв. ГУВ Госагропрома СССР от 01.06.1987)¹ и ГОСТ 26503-85 «Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики клостридиозов»². Изучение морфологических, культуральных и биохимических свойств факультативных анаэробов проводили в соответствии с приказом Минздрава СССР от 22.04.1985 № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений»³.

В лаборатории осуществляли прямой посев бактериологической петлей на плотные питательные среды: Эндо, энтерококкагар, желточно-молочно-солевой агар (инкубация при 37 °С в течение 24–48 ч), Сабуро (инкубация при 30 °С до 5 сут).

По 1 мл разведения смыва в физиологическом растворе засеивали на среду Вильсона – Блера и Китта – Тароцци (инкубация при 37 °С в течение 24 ч под вазелиновым маслом) и в 5%-й глюкозный мясо-пептонный бульон (инкубация при 37 °С в течение 24 ч).

Ростовые и морфологические свойства бактерий. По истечении заданного времени посевы просматривали, отмечали рост микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах. Из среды Китта – Тароцци производили посев на глюкозо-кровяной агар Цейслера (инкубация при 37 °С в течение 24 ч в условиях анаэробно-биоза). Из 5%-го глюкозного мясо-пептонного бульона производили пересев на плотные питательные

среды Эндо, энтерококкагар, желточно-молочно-солевой агар (в случае отсутствия роста на них при прямом посеве из разведения смыва в физиологическом растворе).

Определение биохимических свойств и идентификация бактерий. При наличии роста микроорганизмов на средах Эндо, энтерококкагаре, желточно-молочно-солевом агаре проводили выделение чистой культуры с последующей идентификацией на средах Гисса и постановкой идентифицирующих тестов (каталаза, оксидаза, индол, метиленовое молоко и др.). Все выросшие колонии окрашивали по Граму с последующей микроскопией.

Статистическую обработку результатов проводили с определением относительных величин в процентах, вычисляемых методом деления количества выделенных из каждого органа микроорганизмов на общее количество изолятов, умноженное на 100%⁴.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первым этапом работы был отбор образцов от голштинизированного черно-пестрого скота, содержавшегося привязным методом на животноводческой ферме в Кемеровской области. Для проведения анализа были сформированы две группы животных (с лечением и без) по 5 гол. в каждой. В обе группы входили особи с заболеваниями копытного рога, а также с клиническими симптомами заболеваний копыт: хромота, опора ноги на зацеп, гиперемия кожи межпальцевой щели, выделение гнойного или гнилостного экссудата с неприятным запахом. В первой группе животные не подвергались лечению, они были выявлены в течение недели методом осмотра. Животных другой группы в течение 2–3 нед. лечили препаратом для ухода за кожей дистального отдела конечностей с содержанием медного купороса и оксида цинка.

¹ <https://base.garant.ru/409636355>

² <https://base.garant.ru/5916932>

³ <https://docs.cntd.ru/document/420245293>

⁴ Шорохова И. С., Кисляк Н. В., Маринов О. С. Статистические методы анализа: учебное пособие. Екатеринбург: Уральский университет; 2015. 300 с. https://elar.urfu.ru/bitstream/10995/36122/1/978-5-7996-1633-5_2015.pdf



Рис. 2. Морфология колоний *Fusobacterium* spp. на глюкозо-кровоном агаре Цейслера

Fig. 2. Morphology of *Fusobacterium* spp. colonies on Zeisler's glucose-blood agar

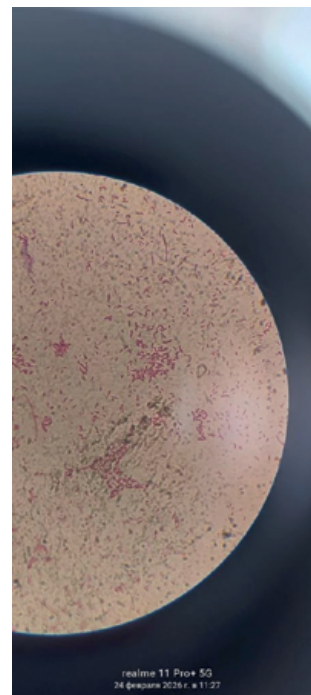
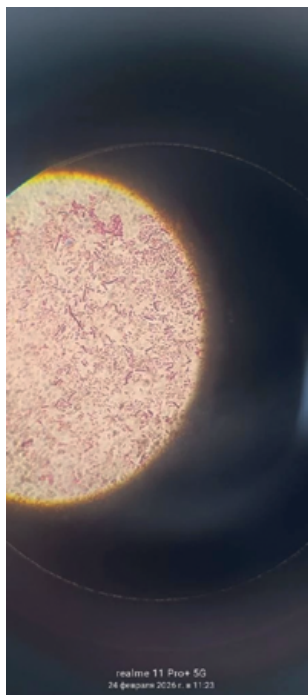


Рис. 3. Морфология клеток бактерий *Fusobacterium* spp. (окраска по Граму, увеличение 1000х)

Fig. 3. Morphology of *Fusobacterium* spp. bacteria (Gram staining, magnification 1,000х)

При отборе проб заднюю больную конечность животного фиксировали на перекладине, расчищали копытный рог ножом. Далее производили осмотр раневой поверхности. В исследование включали животных с ранением копытца и пальцевым дерматитом с экссудатом различного характера: гнойно-некротическим со зловонным запахом, гнойным, катаральным, без экссудата (рис. 1).

Степень заболеваемости оценивали по морфологической классификации:

M1 – ранняя острая стадия заболевания, характеризующаяся мелкими очаговыми поражениями с ограниченной гранулематозной областью диаметром 0,5–4,0 см, которая находится на эпителиальной поверхности или до 2 мм под ней;

M2 – острая стадия, характеризующаяся крупными язвенными поражениями с гранулематозной тканью диаметром до 7 см и глубиной более чем 2 мм, поражения кожи и/или копытный рог;

M3 – язва стадии M2 в процессе заживления, покрытая коркой, обычно после лечения;

M4 – хроническая стадия, характеризующаяся гиперкератозными поражениями, могут наблюдаться пролиферативные явления;

M5 – макроскопически зажившие язвы [1, 5, 6].

В результате бактериологического анализа отобранных проб были выделены и идентифицированы такие микроорганизмы, как *Fusobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*.

Следующим этапом данной работы был анализ биологических (ростовых, морфологических и биохимических) свойств выделенных микроорганизмов, изучение локализации этих бактерий в пораженных

участках копытца, течения болезни в зависимости от наличия тех или иных патогенов, а также сопоставление полученных результатов с данными других исследователей.

Микроорганизмы рода *Fusobacterium* spp. через сутки инкубирования на среде Китта – Тароцци вызывали ее равномерное помутнение; на глюкозо-кровоном агаре Цейслера через сутки регистрировали рост круглых блестящих кремовых опалесцирующих колоний диаметром до 3 мм (рис. 2).

Из выросших колоний микроорганизмов готовили микробиологические препараты и окрашивали их по методу Грама. В результате окрашивания обнаруживали грамотрицательные палочки с зернистостью, расположенные одиночно, парами или цепочками в виде нитей (рис. 3). По ростовым и морфологическим признакам лабораторные культуры относили к микроорганизмам рода *Fusobacterium* spp. Бактерии данного рода обнаруживали во всех отобранных образцах (100%).

Многие авторы уделяют особое внимание роли анаэробных бактерий, таких как *F. necrophorum*, в этиологии болезней копыт у крупного рогатого скота. Существует мнение, что *Fusobacterium* spp. могут быть главной причиной язвенных поражений копыт, которые в дальнейшем контаминируются другими оппортунистическими патогенами. Язвенные болезни копытного рога являются результатом синергетического действия отдельных бактериальных видов, из которых *F. necrophorum* выступает индуктором в развитии патологии [15]. *F. necrophorum* служит синергистом для других видов патогенных бактерий при пальцевых дерматитах [16]. Инвазия и колонизация тканей *F. necrophorum* происходит за счет факторов вирулентности: эндотоксина, лейкотоксина и секретлируемых протеаз [15]. *F. necrophorum* выступает в роли

пассивного инфекционного агента, начинающего размножаться в раневой поверхности только при потере целостности эпителия [6].

Рост микроорганизмов рода *Clostridium* spp. изучали на среде Вильсона – Блера. При этом визуализировалось почернение и газообразование, характеризующееся разрывом среды, с появлением прогорклого запаха масляной кислоты. В пробах от двух животных в группе с лечением клостридии не были обнаружены, таким образом, *Clostridium* spp. выделены из 80% образцов биоматериала. Данные животные находились в стадии МЗ, вследствие проводимого лечения раны были наружные, неглубокие, без экссудата, раневая поверхность небольшая, подсушенная. Микроорганизмы рода *Clostridium* spp. часто выявляют в язвенных поражениях копыт, и они играют важную роль в этиологии этих поражений [15].

Бактерии *K. pneumoniae* культивировали на среде Эндо, отмечали образование розовых крупных слизистых колоний диаметром более 5 мм, что является характерной особенностью их роста. Принадлежность этого изолята к виду *K. pneumoniae* была установлена по биохимическим признакам выращенной культуры. *K. pneumoniae* выявлены во всех отобранных образцах, за исключением одной пробы от животного со стадией М1 из группы с лечением. Wilson-Welder J. H. et al. отмечали наличие микроорганизмов рода *Klebsiella* при болезнях копыт у крупного рогатого скота [13]. *Klebsiella* spp. и другие грамотрицательные представители кишечной микрофлоры являются контаминантами подстилки, почвы и воды. Наличие липополисахаридов в составе наружного слоя внешней мембраны грамотрицательных бактерий способствует развитию гиперергической воспалительной реакции [17]. По мнению K. Yoshida et al., наличие микроорганизмов рода *Klebsiella* spp. утяжеляет течение воспалительного процесса, в том числе из-за образования биопленки, что является важной особенностью патогенеза болезней, вызванных *K. pneumoniae*. Биопленки способствуют повышению устойчивости к неблагоприятным факторам окружающей среды, антибиотикам и дезинфектантам [18]. Существует мнение, что *E. coli*, *Staphylococcus* spp., *Klebsiella oxytoca* и бактерии семейства *Pasteurellaceae* создают условия для колонизации и размножения патогенов, непосредственно вызывающих заболевание [19].

Из проб, отобранных от животных из группы без лечения, также выделяли *S. saprophyticus*, *E. coli*, *E. faecalis*, *E. faecium*. В образцах от животных с лечением указанные виды бактерий обнаружены не были. Учитывая отсутствие данных микроорганизмов у животных, подвергавшихся лечению, можно предположить, что в патогенезе болезни они не играют роли и являются секундарной микрофлорой. Hori K. et al. предположили, что многие бактерии, присутствующие в раневой поверхности при заболеваниях копыт, могут быть вторичными контаминантами [20].

ВЫВОДЫ

1. Основными контаминантами, изолированными при язвенных поражениях копыт у крупного рогатого скота, являются микроорганизмы родов *Fusobacterium* spp. и *Clostridium* spp., а также бактерии *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*.

2. Учитывая 100%-ю встречаемость *Fusobacterium* spp. в образцах от животных, получавших лечение, и коров

без лечения, можно предположить основную роль фузобактерий в развитии язвенных поражений копыт.

3. Микроорганизмы рода *Clostridium* spp. из неглубоких поражений с подсушенной корочкой не изолировали. Для их развития необходимы более глубокие поражения тканей, обеспечивающие им анаэробные условия. Соответственно, в глубоких гнойно-экссудативных поражениях микроорганизмы этого рода выделяли в 100% случаев.

4. При поражениях копыт крупного рогатого скота выявлена значительная контаминация язвенной поверхности ран *Klebsiella pneumoniae* (90%).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Berry S. L., Read D. H., Famula T. R., Mongini A., Döpfer D. Long-term observations on the dynamics of bovine digital dermatitis lesions on a California dairy after topical treatment with lincomycin HCl. *The Veterinary Journal*. 2012; 193 (3): 654–658. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.06.048>
- Wong N. S. T., Malmuthge N., Gellatly D., Nordi W. M., Alexander T. W., Ortega Polo R., et al. Characterization of the hoof bacterial communities in feedlot cattle affected with digital dermatitis, foot rot or both using a surface swab technique. *Animal Microbiome*. 2024; 6 (1):2. <https://doi.org/10.1186/s42523-023-00277-1>
- Ali S., Avais M., Durrani A. Z., Ashraf K., Bilal M., Nasir A., et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of some antimicrobials and disinfectants against bacterial pathogens from hoof lesions in dairy cattle. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2021; 22 (1): 9–14. <https://doi.org/10.22099/ijvr.2020.37776.5493>
- Espiritu H. M., Kwon S. W., Lee S. S., Cho Y. I. Surveillance of hoof disorders in Korean dairy cattle and the correlation of farm condition risk factors to their prevalence. *BMC Veterinary Research*. 2025; 21:169. <https://doi.org/10.1186/s12917-025-04628-9>
- Döpfer D., Koopmans A., Meijer F. A., Szakáll I., Schukken Y. H., Klee W., et al. Histological and bacteriological evaluation of digital dermatitis in cattle, with special reference to spirochaetes and *Campylobacter faecalis*. *Veterinary Record*. 1997; 140 (24): 620–623. <https://doi.org/10.1136/vr.140.24.620>
- Pyakurel S., Caddey B. J., Dias A. P., De Buck J., Morck D. W., Orsel K. Profiling bacterial communities in feedlot cattle affected with bovine foot rot and bovine digital dermatitis lesions using 16S rRNA gene sequencing and quantitative real-time PCR. *BMC Microbiology*. 2025; 25:158. <https://doi.org/10.1186/s12866-025-03869-w>
- Dias A. P., De Buck J. Detection and quantification of bacterial species DNA in bovine digital dermatitis lesions in swabs and fine-needle aspiration versus biopsies. *Frontiers in Veterinary Science*. 2022; 9:1040988. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1040988>
- Gillespie A. V., Carter S. D., Blowey R. W., Staton G. J., Evans N. J. Removal of bovine digital dermatitis-associated treponemes from hoof knives after foot-trimming: a disinfection field study. *BMC Veterinary Research*. 2020; 16:330. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02552-8>
- Erickson S. E., Jelinski M. D., Booker C. W., Janzen E., Schwartzkopf-Genswein K. A review of foot-related lameness in feedlot cattle. *Canadian Journal of Animal Science*. 2024; 104 (4): 420–435. <https://doi.org/10.1139/cjas-2024-0047>
- Garvey M. Lameness in dairy cow herds: disease aetiology, prevention and management. *Dairy*. 2022; 3 (1): 199–210. <https://doi.org/10.3390/dairy3010016>
- Alsaad M., Weber J., Jensen T., Brandt S., Gurtner C., Devaux D., et al. “Non-healing” claw horn lesions in dairy cows: clinical, histopathological and molecular biological characterization of four cases. *Frontiers in Veterinary Science*. 2022; 9:1041215. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1041215>
- Bay V., Griffiths B., Carter S., Evans N. J., Lenzi L., Bicalho R. C., Oikonomou G. 16S rRNA amplicon sequencing reveals a polymicrobial nature of complicated claw horn disruption lesions and interdigital phlegmon in dairy cattle. *Scientific Reports*. 2018; 8:15529. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33993-9>
- Wilson-Welder J. H., Alt D. P., Nally J. E. Digital dermatitis in cattle: current bacterial and immunological findings. *Animals*. 2015; 5 (4): 1114–1135. <https://doi.org/10.3390/ani5040400>
- Walker K. E., Middleton J. R., Gull T., Payne C. A., Adkins P. R. F. Bacterial culture and susceptibility of samples taken from septic foot lesions of adult beef cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2023; 37 (2): 757–765. <https://doi.org/10.1111/jvim.16645>
- Nazifi S., Esmailnezhad Z., Haghighi M., Ghadiri S., Mirzaei A. Acute phase response in lame cattle with interdigital dermatitis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012; 28 (4): 1791–1796. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0995-9>

16. Dias A. P., Orsel K., Gammariello C. S., De Buck J. Sequential emergence and quantitative dynamics of key bacterial species preceding digital dermatitis lesion onset in dairy cattle. *Veterinary Microbiology*. 2025; 302:110378. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2025.110378>

17. Vidu L., Enea D. N., Mărginean G.-E., Grigoraş Mihai A., Vlăsceanu L.-F. Health Challenges for High-Producing Dairy Cows and Buffaloes. In: *Bovine Medicine – Education and Practice*. Ed. by K. R. Petrovski. IntechOpen; 2025. <https://doi.org/10.5772/intechopen.1012536>

18. Yoshida K., Matsumoto T., Tateda K., Uchida K., Tsujimoto S., Yamaguchi K. Role of bacterial capsule in local and systemic inflammatory responses of mice during pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Medical Microbiology*. 2000; 49 (11): 1003–1010. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-11-1003>

19. Urban-Chmiel R., Mudroň P., Abramowicz B., Kurek Ł., Stachura R. Lameness in cattle – etiopathogenesis, prevention and treatment. *Animals*. 2024; 14 (12):1836. <https://doi.org/10.3390/ani14121836>

20. Hori K., Taniguchi T., Elpita T., Khemgaew R., Sasaki S., Gotoh Y., et al. Comprehensive analyses of the bacterial population in non-healing claw lesions of dairy cattle. *Animals*. 2022; 12 (24):3584. <https://doi.org/10.3390/ani12243584>

Поступила в редакцию / Received 15.04.2026

Поступила после рецензирования / Revised 24.06.2026

Принята к публикации / Accepted 17.07.2026

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Метлева Анастасия Сергеевна, канд. вет. наук, доцент кафедры ветеринарной медицины и биотехнологий, заведующий лабораторией биохимических, молекулярно-генетических исследований и селекции сельскохозяйственных животных, Кузбасский ГАУ, г. Кемерово, Россия; <https://orcid.org/0009-0001-5454-8122>, zveryski@mail.ru

Нагибина Дарья Дмитриевна, студент, Кузбасский ГАУ, г. Кемерово, Россия; <https://orcid.org/0009-0001-3781-0758>, nagibina.dash@mail.ru

Филатов Вячеслав Юрьевич, аспирант, Кузбасский ГАУ, г. Кемерово, Россия; <https://orcid.org/0009-0005-0161-2898>, veterinaromsk2008@mail.ru

Anastasiya S. Metleva, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Associate Professor of the Department of Veterinary Medicine and Biotechnology, Head of the Laboratory of Biochemical, Molecular Genetic Research and Breeding of Farm Animals, Kuzbass State Agrarian University named after V. N. Poletskov, Kemerovo, Russia; <https://orcid.org/0009-0001-5454-8122>, zveryski@mail.ru

Darya D. Nagibina, student, Kuzbass State Agrarian University named after V. N. Poletskov, Kemerovo, Russia; <https://orcid.org/0009-0001-3781-0758>, nagibina.dash@mail.ru

Vyacheslav Yu. Filatov, Postgraduate Student, Kuzbass State Agrarian University named after V. N. Poletskov, Kemerovo, Russia; <https://orcid.org/0009-0005-0161-2898>, veterinaromsk2008@mail.ru

Вклад авторов: Метлева А. С. – формирование идеи, анализ и интерпретация полученных результатов, составление черновика рукописи, принятие ответственности за все аспекты работы; Нагибина Д. Д. – подготовка рисунков, проведение исследований; Филатов В. Ю. – проведение экспериментов, сбор данных.

Contribution of the authors: Metleva A. S. – study concept, study result analysis and interpretation, manuscript drafting, bearing responsibility for all study aspects; Nagibina D. D. – drawings preparation, testing; Filatov V. Yu. – experiments, data collection.



<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-296-302>
УДК 619:579.873.21:001.891



Реактивация культур микобактерий, выделенных из биоматериала животных и образцов внешней среды, с бактериологической, молекулярно-биологической и молекулярно-генетической идентификацией

С. В. Ионина¹, Е. И. Гордеева²

¹ ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук», Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока (ИЭВСИДВ СФНЦА РАН), р. п. Краснообск, 630501, Новосибирская область, Россия

² ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИИТ» Минздрава России), ул. Охотская, 81а, г. Новосибирск, 630040, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. В современной микробиологии сбор и поддержание коллекций микроорганизмов в рабочем состоянии являются наиболее важными направлениями практической деятельности микробиологической лаборатории.

Цель исследования. Осуществление процесса реактивации нежизнеспособных культур микобактерий, выделенных из биоматериала животных и образцов внешней среды, на жидких и плотных питательных средах с ростовой добавкой с последующим бактериологическим, молекулярно-биологическим и молекулярно-генетическим типированием восстановленных патогенов.

Материалы и методы. Процесс реактивации включал в себя посев культур на жидкую среду Middlebrook 7H9 и плотную среду Левенштейна – Йенсена с использованием ростовой добавки OADC. Последующую идентификацию микобактерий проводили методом времяпролетной масс-спектрометрии и методом гибридизации на микрочипе с помощью тест-системы «МИКО-Биочип» (Россия).

Результаты. Для эксперимента *in vitro* отобрано 75 образцов культур микобактерий, полученных при обработке биоматериала животных и объектов внешней среды и находящихся в некультивируемом состоянии. Реактивировано 46 (61,3%) культур, среди которых идентифицированы *Mycobacterium tuberculosis* (4,3%) и нетуберкулезные микобактерии следующих видов: медленно растущие патогенные *Mycobacterium avium* (65,2%) и *Mycobacterium intracellulare* (2,2%); медленно растущие непатогенные *Mycobacterium nonchromogenicum* (15,2%) и *Mycobacterium monacense* (2,2%); быстрорастущие патогенные *Mycobacterium fortuitum* (4,3%) и *Mycobacterium abscessus* (2,2%), быстрорастущие условно-патогенные *Mycobacterium neoaurum* (2,2%), а также *Mycobacterium kyogaense* (2,2%). Ведущая роль среди реактивированных культур принадлежала микобактериям III группы нетуберкулезных микобактерий согласно классификации Раньона: *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium nonchromogenicum*, *Mycobacterium intracellulare*.

Заключение. Осуществлена реактивация 46 из 75 патогенов полевых изолятов микобактерий в условиях микробиологической лаборатории, позволяющих получить жизнеспособные популяции, что свидетельствует об эффективности использованного метода реактивации. Сохранены основные характеристики полученных культур и разнообразие видов микобактерий в коллекции. Результаты проведенных исследований можно использовать для оптимизации лабораторной микробиологической диагностики туберкулеза.

Ключевые слова: микобактерии, жизнеспособность культур, добавка OADC, бактериологическая, молекулярно-биологическая и молекулярно-генетическая идентификация

Благодарности: Исследование выполнено за счет бюджетных средств в рамках исполнения государственного задания № 0533-2021-0018 (СФНЦА РАН).

Для цитирования: Ионина С. В., Гордеева Е. И. Реактивация культур микобактерий, выделенных из биоматериала животных и образцов внешней среды, с бактериологической, молекулярно-биологической и молекулярно-генетической идентификацией. *Ветеринария сегодня*. 2026; 15 (3): 296–302. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-296-302>

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Ионина Светлана Владимировна, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории туберкулеза сельскохозяйственных животных ИЭВСИДВ СФНЦА РАН, р. п. Краснообск, 630501, Новосибирская область, Россия, labtub@mail.ru

Reactivation of mycobacterial cultures isolated from animal biomaterial and environmental samples, with bacteriological, molecular biological, and molecular genetic identification

Svetlana V. Ionina¹, Elizaveta I. Gordeeva²

¹ Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East, Krasnoobsk 630501, Novosibirsk Oblast, Russia

² Novosibirsk Tuberculosis Research Institute of the Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Okhotskaya, 81a, Novosibirsk 630040, Russia

© Ионина С. В., Гордеева Е. И., 2026

ABSTRACT

Introduction. In modern microbiology, the collection and maintenance of microorganism collections in working order is one of the most important areas of practical activity in a microbiological laboratory.

Objective. To carry out reactivation of non-viable mycobacterial cultures isolated from animal biomaterial and environmental samples in liquid and solid nutrient media with a growth supplement, followed by bacteriological, molecular biological and molecular genetic typing of the recovered pathogens.

Materials and methods. The reactivation process involved inoculating the cultures in Middlebrook 7H9 liquid medium and Löwenstein – Jensen solid medium using OADC growth supplement. Subsequent mycobacteria identification was performed using time-of-flight mass spectrometry and microarray hybridization with the MYCO-BIOCHIP (Russia) test system.

Results. For the *in vitro* experiment, 75 mycobacterial culture samples in a non-culturable state, obtained from processed animal biomaterial and environmental specimens, were selected. A total of 46 (61.3%) cultures were reactivated, among which *Mycobacterium tuberculosis* (4.3%) and non-tuberculous mycobacteria of the following species were identified: slow-growing pathogenic *Mycobacterium avium* (65.2%) and *Mycobacterium intracellulare* (2.2%); slow-growing non-pathogenic *Mycobacterium nonchromogenicum* (15.2%) and *Mycobacterium monacense* (2.2%); fast-growing pathogenic *Mycobacterium fortuitum* (4.3%) and *Mycobacterium abscessus* (2.2%), fast-growing opportunistic *Mycobacterium neoaurum* (2.2%) and *Mycobacterium kyogaense* (2.2%). Among the reactivated cultures, the leading role belonged to group III non-tuberculous mycobacteria according to Runyon's classification: *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium nonchromogenicum*, *Mycobacterium intracellulare*.

Conclusion. Under microbiological laboratory conditions, 46 out of 75 field isolates of mycobacteria were successfully reactivated, yielding viable cultures and demonstrating the effectiveness of the reactivation method used. The key characteristics of the obtained cultures and the species diversity of the mycobacterial collection were preserved. The results of this study can be used to optimize laboratory microbiological diagnostics of tuberculosis.

Keywords: mycobacteria, culture viability, OADC supplement, molecular biological and molecular genetic identification

Acknowledgments: The study was carried out using budgetary funds within the framework of state assignment No. 0533-2021-0018 (Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences).

For citation: Ionina S. V., Gordeeva E. I. Reactivation of mycobacterial cultures isolated from animal biomaterial and environmental samples, with bacteriological, molecular biological, and molecular genetic identification. *Veterinary Science Today*. 2026; 15 (3): 296–302. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-296-302>

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

For correspondence: Svetlana V. Ionina, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Tuberculosis of Farm Animals, Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East, Krasnoobsk 630501, Novosibirsk Oblast, Russia, labtub@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

В современной микробиологии накопление и поддержание коллекций микроорганизмов являются наиболее важными направлениями практической деятельности, так как благодаря этому становится возможным детальное исследование возбудителей [1]. Коллекции микроорганизмов возникли благодаря методу выделения чистых культур на искусственных питательных средах, который впервые использовал Роберт Кох [2]. Сохранение коллекционного фонда различных патогенов в течение длительного времени без потери их биологических свойств является важнейшей задачей, так как объединенные в подобные сообщества культуры позволяют решать фундаментальные и прикладные задачи для научных и сельскохозяйственных целей. Основной функцией коллекционной деятельности является сохранение патогенов в неизменном и рабочем состоянии для использования их в экспериментах, так как данный процесс – обязательное условие любой работы с микроорганизмами [3, 4, 5, 6, 7].

Создание и ведение коллекций бактерий требуется не только для обеспечения работы микробиологической лаборатории, но и для мониторинга инфекций и разработки новых подходов в борьбе с ними [8, 9]. Для этого необходимо создать оптимальные условия длительного хранения культур бактерий, которые позволят максимально сохранить клетки в жизнеспособном состоянии (жизнеспособность, в частности микобактерий туберкулеза, связана и с продолжитель-

ностью, и с температурой хранения) без изменения их биохимических, физиологических и производственно-ценных свойств [10, 11, 12]. Хранение бактериальных культур в лабораторных условиях достаточно проблематично, так как культивирование большей части микроорганизмов затруднено в искусственных условиях, кроме того, в цикле развития любых бактерий возможна смена периода активного роста на период образования неактивных форм, характеризующихся снижением активности процесса метаболизма [1, 2]. Такие формы бактерий получили название «жизнеспособных, но некультивируемых», сохраняющих при этом структурную целостность в течение длительного времени. Вследствие изменения метаболической активности происходит снижение потенциала роста данных культур на стандартных лабораторных жидких и плотных питательных средах, что затрудняет их дальнейшее культивирование, так как в ходе естественного роста микроорганизмов наблюдается существенное понижение концентрации питательных компонентов среды, приводящее к уменьшению бактериальной популяции [13, 14, 15]. В то же время при отсутствии способности роста на питательных средах жизнеспособность таких бактерий подтверждается наличием специфического окрашивания [16]. Также следует отметить, что для некоторых бактерий существуют условия *in vitro*, которые ограничивают воспроизведение, но в то же время позволяют оставаться культивируемыми.

Для восстановления способности к росту и образованию колоний у форм с пониженным уровнем метаболической активности целесообразно проведение процедуры реактивации, хотя наличие таких форм потребует более длительного времени культивирования, чем указано в существующих методиках [17, 18]. Несмотря на довольно низкий уровень метаболической активности бактерий с пониженной жизнеспособностью, в них не происходит существенных морфологических и биохимических изменений. Поэтому создание оптимальных условий микробиологических исследований приводит к реактивации роста таких патогенов на различных питательных средах при наличии в их составе необходимых питательных или стимулирующих субстратов [19, 20].

Считается, что переход бактерий в состояние покоя и «некультивируемости» играет важную роль в выживании микроорганизмов в неблагоприятных условиях. Благодаря этому адаптивному механизму бактерии могут свести к минимуму повреждения клеточных структур в стрессовых условиях и сохранять потенциал к реактивации достаточно длительный период времени [16]. Необходимо отметить, что при процессе реактивации, в частности микобактерий, существует ряд серьезных, затрудняющих его осуществление проблем, таких как длительная задержка роста, выработка собственных ингибиторов размножения, а также потребность в специфических стимуляторах роста в процессе реактивации [17]. Понимание механизмов перехода бактерий в состояние покоя и возвращения к активному делению требует новых подходов, включающих прежде всего разработку соответствующих моделей *in vitro*. Помимо этого, исследование механизмов перехода бактерий в состояние покоя с последующим восстановлением активной регенерации требует понимания особенностей данного процесса для разработки соответствующих методик микробиологических технологий. Полученные данные могут быть использованы для поиска новых эффективных решений проблемы сохранения жизнеспособности бактерий на основе разработки усовершенствованных методов культивирования покоящихся патогенов [16, 17].

Актуальность и новизна проведенных исследований заключается в изучении способности к реактивации культур полевых изолятов микобактерий, выделенных из биоматериала животных и объектов внешней среды на территории Западно-Сибирского региона.

Цель исследований – осуществить процесс реактивации нежизнеспособных культур микобактерий, выделенных из биоматериала животных и образцов внешней среды, на жидких и плотных питательных средах с ростовой добавкой, с последующим бактериологическим, молекулярно-биологическим и молекулярно-генетическим типированием.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и изоляты. Материалом для исследований *in vitro* являлись 75 образцов культур полевых изолятов микобактерий, полученных при обработке биологического материала животных и объектов внешней среды методом А. П. Аликаевой¹ и находящихся

на момент исследования в некультивируемом состоянии. Некультивируемость изучаемых культур оценивали как изменение морфологии колоний и отсутствие роста бактериальной массы на поверхности плотной питательной среды Левенштейна – Йенсена.

Питательные среды и растворы. Для первоначального посева исследуемых культур микобактерий использовали жидкую питательную среду Middlebrook 7H9 (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Индия). В качестве основного ростового стимулятора для реактивации патогенов жидкая среда включала ростовую добавку для микобактерий OADC (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Индия) в соотношении 1:10.

Реактивация и культивирование микобактерий. В пробирку с исследуемой культурой микобактерий вносили 1 мл жидкой среды. Суспендировали культуру бактериологической лопаткой, полученную суспензию переносили в стерильную пробирку, в которую добавляли ростовую добавку OADC в указанном соотношении. Пробирки помещали в термостат и инкубировали при 37 °C в течение 14 сут. Затем полученные суспензии переносили в пробирки со средой Левенштейна – Йенсена с добавлением ростовой добавки OADC в количестве 10 мкл/мл. Пробирки со средой помещали в скошенном положении, под углом 45°, в термостат при 37 °C на 7 сут, затем переносили в вертикальные штативы для дальнейшего инкубирования в течение 35 сут. Посевы просматривали каждый день в течение первых 15 сут, затем – 2 раза в неделю. Результаты реактивации оценивали по появлению видимых колоний на поверхности плотной питательной среды Левенштейна – Йенсена и способности к увеличению бактериальной массы в течение всего срока культивирования.

Идентификация и дифференциация изолятов. Проводили микроскопические исследования полученных культур путем окрашивания мазков по методике Циля – Нильсена для выявления кислотоустойчивости колоний. Оценивали фенотипические (ростовые, морфологические) свойства полученных микроорганизмов. Проводили стандартные биохимические тесты для первичной дифференциации возбудителя: определение наличия или отсутствия пигмента на свету и в темноте, роста колоний на плотной среде с добавлением салицилата натрия, редукции нитратов, гидролиза твин-80^{2,3}.

Последующую видовую идентификацию полученных жизнеспособных культур полевых изолятов микобактерий осуществляли в бактериологической лаборатории ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «ННИИТ» Минздрава России) молекулярно-биологическим методом времяпролетной масс-спектрометрии на приборе Microflex MALDI-ToF (Bruker, Германия) и молекулярно-генетическим методом гибридизации на микрочипе с использованием тест-системы «МИКО-Биочип» (Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Россия). Метод времяпролетной масс-спектрометрии на приборе

¹ ГОСТ 26072–89 (СТ СЭВ 3457–81) Животные и птица сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики туберкулеза. <https://docs.cntd.ru/document/1200025492>

² Лабораторная диагностика туберкулеза: рекомендации. Омск; 1988. 66 с.

³ Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994. 787 p.

Microflex MALDI-ToF позволяет анализировать белковую фракцию микробной клетки и получать с высокой точностью и разрешением уникальные для данного вида микроорганизма масс-спектры. Тест-система «МИКО-Биочип» представляет собой высокотехнологичный метод молекулярно-генетической диагностики, основанный на гибридизации на биологическом микрочипе. Этот метод используется для ранней диагностики туберкулеза и идентификации видов микобактерий.

Статистическая обработка результатов была проведена с применением критерия хи-квадрат (квaдрат Пирсона, χ^2) для оценки связи между реактивацией и патогенностью микобактерий. Также рассчитывали экстенсивные показатели: процентное отношение количества каждого вида реактивированных культур микобактерий к общему числу реактивированных культур.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Реактивацию культур микобактерий осуществляли на базе лаборатории туберкулеза сельскохозяйственных животных Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук» в 2023–2024 гг. В микробиологической практике лаборатории существует процедура сохранения культур полевых изолятов, выделенных в различные периоды из образцов биоматериала животных (лимфатические узлы и внутренние органы животных) и объектов внешней среды (вода с территорий пастбищ, из поилок животных, из водоема доильной площадки и естественных водоемов; навоз из коровника и с доильной площадки, а также с территории пастбища; почва с территории пастбищ и выпасов; сено, силос и сенаж). Первоначальная микробиологическая идентификация данных культур, проведенная на основании прямой микроскопии, морфологических и биохимических свойств, а также при постановке биологической пробы на восприимчивых лабораторных животных (морские свинки и кролики), определила наличие среди них патогенных микобактерий и нетуберкулезных микобактерий, входящих в III и IV группы согласно классификации Раньона [21]. Наблюдали, что при длительном хранении при температуре 4 °C на плотной питательной среде Левенштейна – Йенсена исследуемые культуры могут терять способность к дальнейшему росту на плотных питательных средах в течение всего срока хранения и вследствие этого могут переходить в состояние покоя. При этом отмечали изменение ростовых и морфологических свойств культур микобактерий и утрату их способности активно расти в виде колоний на плотных питательных средах. Из данных патогенов отобрали 75 образцов, полученных при обработке биологического материала животных (лимфатические узлы крупного рогатого скота – 56 образцов и свиной – 17 образцов) и объектов внешней среды (почва с доильной площадки – 2 образца), для реактивации жизнеспособности полевых изолятов микобактерий.

На первом этапе сохранившиеся в 75 пробирках и суспендированные колонии микобактерий культивировали в жидкой питательной среде Middlebrook 7H9 с добавлением ростовой добавки OADC в течение 14 сут. Продолжительность инкубирования вызвана тем, что в процессе реактивации некультивируемые микобактерии секретируют в окружающую среду

ингибирующие вещества, вызывающие торможение роста клеток. Действие этих веществ зависит от продолжительности инкубации некультивируемых клеток в жидкой питательной среде, и снижение их ингибирующей активности происходит при увеличении времени инкубации более 11 сут [17].

В пробирках с жидкой средой Middlebrook 7H9 и ростовой добавкой OADC через 14 сут инкубирования наблюдали помутнение среды или появление осадка на дне пробирки со средой. Дальнейший пересев инокулюмов на плотную питательную среду Левенштейна – Йенсена показал появление роста колоний культур в 46 из 75 пробирок (61,3%) в период с 7-х по 31-е сут. Отсутствие роста колоний культур исследованных микобактерий во всех пробирках может быть объяснено низкой концентрацией возбудителя в инокулюме, а также присутствием большого объема субстрата плотной питательной среды, с которой производили приготовление бактериальной суспензии для дальнейшего посева. Использование плотной питательной среды Левенштейна – Йенсена в данном опыте как основной обусловлено тем, что в ветеринарной практике данная среда является основным стандартом микробиологических исследований при туберкулезе. Исследования проведены в трех повторностях.

Бактериологическая идентификация. Прямая микроскопия мазков реактивированных колоний, окрашенных по методике Циля – Нильсена, выявила присутствие во всех мазках утолщенных коротких красных зернистых кислотоустойчивых палочек, что характерно для нетуберкулезных микобактерий, и тонких длинных красных зернистых кислотоустойчивых палочек в виде кос (корд-фактор), что является признаком патогенных туберкулезных микобактерий. Фенотипическая оценка реактивированных культур показала наличие в 37 пробирках выпуклых и плоских слизистых колоний бежевого цвета, слившихся между собой и расположенных отдельно друг от друга. В 7 пробирках наблюдали рост мелких и крупных шероховатых колоний светлого и бежевого цвета, отдельных и слившихся между собой. В одной пробирке росли слизистые слившиеся колонии желтого цвета, еще в одной – слизистые слившиеся колонии оранжевого цвета. Биохимические исследования культур выявили следующие характеристики: отсутствие образования пигмента наблюдали у 45 патогенов, пигмент оранжевого цвета в темноте – у одной культуры. Способность расти в присутствии салицилата натрия проявили 44 культуры, у 2 культур данный признак отсутствовал. Нитратредуктазная активность обладали 9 культур: у 7 культур указанная характеристика была слабо выраженной, у 2 культур – явно положительной; у 37 патогенов отмечали отрицательную редукцию нитратов. Отрицательная реакция гидролиза твин-80 наблюдалась у 40 культур, положительная – у 6 культур.

Таким образом, ростовые, морфологические и биохимические свойства реактивированных культур совпадают с первоначальными признаками, указывающими на их принадлежность к туберкулезным и нетуберкулезным микобактериям III и IV групп согласно классификации Раньона, что подтверждает сохранение при процессе оживления основных свойств микобактерий, выведенных из состояния покоя, и эффективность для проведения подобных исследований жидкой питательной среды Middlebrook 7H9

Таблица
Количество видов реактивированных культур микобактерий

Table
Number of reactivated mycobacterial culture species

Реактивированные культуры (n = 46)	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2 культуры (4,3%)
<i>Mycobacterium avium</i>	30 культур (65,2%)
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	1 культура (2,2%)
<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	7 культур (15,2%)
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	2 культуры (4,3%)
<i>Mycobacterium abscessus</i>	1 культура (2,2%)
<i>Mycobacterium neoaurum</i>	1 культура (2,2%)
<i>Mycobacterium kyogaense</i>	1 культура (2,2%)
<i>Mycobacterium monacense</i>	1 культура (2,2%)

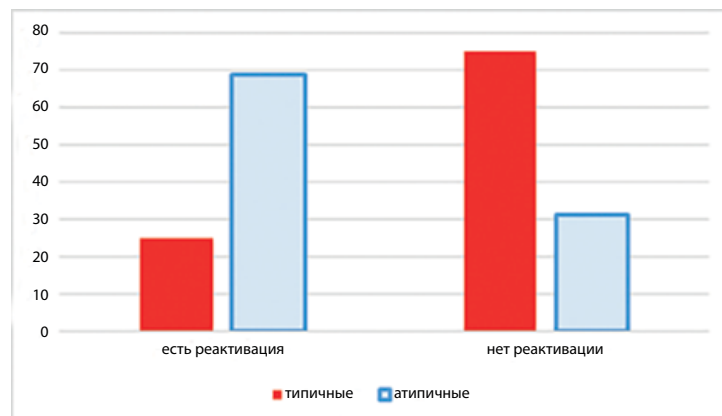


Рис. Эффективность реактивации типичных и атипичных микобактерий (%)

Fig. Reactivation efficiency of typical and atypical mycobacteria (%)

и плотной питательной среды Левенштейна – Йенсена с добавлением ростовой добавки OADC. Данные исследований, проведенных Г. Р. Деминой и соавт. [17], по выявлению особенности реактивации «некультивируемых» клеток *Mycobacterium tuberculosis* также говорят о стимулирующем влиянии на их реактивацию и размножение добавок в жидкие питательные среды.

В то же время, согласно литературным данным, для осуществления таких экспериментов возможно использование и других жидких питательных сред, в частности среды Сотона. Также, помимо добавки OADC, которая считается стимулятором роста именно микобактерий, указывается на возможность использования для реактивации и последующего размножения микобактерий мясо-пептонного бульона в составе среды Сотона [17].

На базе бактериологической лаборатории ФГБУ «ННИИТ» Минздрава России в результате проведения молекулярно-биологической и молекулярно-генетической идентификации 46 реактивированных культур штаммов и полевых изолятов установлены следующие виды микобактерий: патогенные *Mycobacterium tuberculosis* (2 культуры; 4,3%), медленно растущие патогенные нетуберкулезные микобактерии *Mycobacterium avium* (30 культур; 65,2%)

и *Mycobacterium intracellulare* (1 культура; 2,2%); медленно растущие непатогенные нетуберкулезные микобактерии *Mycobacterium nonchromogenicum* (7 культур; 15,2%) и *Mycobacterium monacense* (1 культура; 2,2%); быстро растущие патогенные нетуберкулезные микобактерии *Mycobacterium fortuitum* (2 культуры; 4,3%) и *Mycobacterium abscessus* (1 культура; 2,2%); быстро растущие условно-патогенные нетуберкулезные микобактерии *Mycobacterium neoaurum* (1 культура; 2,2%), а также нетуберкулезные микобактерии *Mycobacterium kyogaense* (1 культура; 2,2%), которые, согласно литературным данным, являются новым видом, относящимся к нетуберкулезным быстро растущим скотохромогенным микобактериям, не входящим ни в одну из групп согласно классификации Раньона [22] (табл.).

Установлено, что основное количество (38 культур, 82,6%) из реактивированной популяции принадлежало патогенам, входящим в III группу нетуберкулезных микобактерий согласно классификации Раньона: *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium nonchromogenicum*, *Mycobacterium intracellulare*. Остальные составляли патогенные микобактерии вида *Mycobacterium tuberculosis* и нетуберкулезные микобактерии IV группы в соответствии с классификацией Раньона, такие как *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium neoaurum*, *Mycobacterium monacense* (рис.).

При анализе взаимосвязи между патогенностью микобактерий (патогенные и нетуберкулезные микобактерии) и реактивацией значение критерия согласия Пирсона составило $\chi^2 = 5,912$ ($p = 0,016$). Как следует из рисунка, нетуберкулезных микобактерий при реактивации больше в 2,74 раза, чем патогенных культур, что свидетельствует о том, что нетуберкулезные микобактерии в большей степени подвержены процессу реактивации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведения реактивации 75 некультивируемых культур полевых изолятов микобактерий с использованием ростовой добавки OADC на жидкой питательной среде Middlebrook 7H9 и плотной питательной среде Левенштейна – Йенсена получено и осуществлено накопление бактериальной массы

жизнеспособных микобактерий. Реактивировано 46 изолятов (61,3%), что свидетельствует об эффективности данного метода. Жизнеспособные культуры включали патогенные (2 культуры) и нетуберкулезные (44 культуры) микобактерии. Метод позволит сохранить разнообразие видов в коллекции микроорганизмов и проводить дальнейшее углубленное молекулярно-генетическое типирование воспроизведенных культур. Отмечено сохранение основных микробиологических характеристик полученных культур, таких как ростовые, морфологические и биохимические свойства. Реактивация позволила провести молекулярно-биологическую и молекулярно-генетическую идентификацию полевых изолятов микобактерий, выделенных из биологического материала и объектов внешней среды на территории Западно-Сибирского региона. Результаты проведенных исследований можно использовать для оптимизации лабораторной микробиологической диагностики туберкулеза, в частности сохранения жизнеспособности коллекционных культур штаммов и полевых изолятов микобактерий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Курилова А. Е., Лебедева А. Ю., Богун А. Г. Накопление мутаций в геномах микроорганизмов в процессе длительного хранения и культивирования. *Бактериология*. 2021; 6 (4): 84–93. <https://elibrary.ru/hcbaqs>
- Blevins S. M., Bronze M. S. Robert Koch and the 'golden age' of bacteriology. *International Journal of Infectious Diseases*. 2010; 14 (9): e744–e751. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.12.003>
- Van Hop D. Establishment and management of culture collections of microorganisms (mbrc): an overview. In: *Microbial Resource Conservation: Conventional to Modern Approaches*. Eds. S. K. Sharma, A. Varma. Cham: Springer; 2018; Chapter 3: 55–109. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96971-8_3
- Маркин В. А. Коллекции патогенных вирусов в решении общепатологических проблем. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2007; (6): 84–93. <https://elibrary.ru/iisqft>
- Онищенко Г. Г., Кутырев В. В., Осин А. В. Коллекционная деятельность в области использования патогенных микроорганизмов в обеспечении биологической безопасности Российской Федерации. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2016; (1): 37–46. <https://elibrary.ru/vretot>
- Morgan C. A., Herman N., White P. A., Vesey G. Preservation of microorganisms by drying: a review. *Journal of Microbiological Methods*. 2006; 66 (2): 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>
- Сидорчук А. А., Краснова А. А. Сохранность культур бактерий различных групп при длительном хранении в лиофилизированном состоянии. *Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные*. 2016; (3): 22–25. <https://elibrary.ru/witnij>
- Pennings L. J., Zweijpenning S., Ruth M. M., Wattenberg M., Boeree M. J., Hoefsloot W., van Ingen J. *Mycobacterium avium* complex bacteria remain viable in sputum during storage and refrigeration. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2018; 92 (4): 309–310. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.06.017>
- Griffith D. E., Adjemian J., Brown-Elliott B. A., Philley J. V., Prevots D. R., Gaston C., et al. Semiquantitative culture analysis during therapy for *Mycobacterium avium* complex lung disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2015; 192 (6): 754–760. <https://doi.org/10.1164/rccm.201503-0444OC>
- Умпелева Т. В., Еремеева Н. И., Вахрушева Д. В. Разработка технологии длительного хранения культур микобактерий туберкулеза. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2021; 23 (4): 404–408. <https://doi.org/10.36488/cmhc.2021.4.404-408>
- Кишилова С. А., Леонова В. А., Митрова В. А., Рожкова И. В. Основные методы сохранения жизнеспособности и свойств микроорганизмов при разных сроках хранения: обзор. *Пищевая промышленность*. 2025; 2: 78–84. <https://doi.org/10.52653/PPI.2025.2.2.016>
- Kwon B. S., Park J. S., Shin J.-A., Kim E. S., Lim S. Y., Song M. J., et al. A prospective study on the long-term storage of sputum and the recovery of nontuberculous mycobacteria. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*. 2023; 17:17534666231162244. <https://doi.org/10.1177/17534666231162244>
- Мулюкин А. Л., Демкина Е. В., Кряжевских Н. А., Сузина Н. Е., Воробьева Л. И., Дуда В. И. и др. Покоящиеся формы *Micrococcus luteus* и *Arthrobacter globiformis*, не прорастающие на стандартных средах. *Микробиология*. 2009; 78 (4): 456–468. <https://elibrary.ru/kptljf>
- Oliver J. D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 2010; 34 (4): 415–425. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x>

- Oliver J. D. The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology*. 2005; 43 (Sp): 93–100. <https://www.jmicrobiol.or.kr/upload/pdf/jm-43-1-93.pdf>
- Shleeva M., Kondratieva T., Rubakova E., Vostrokнутova G., Kaprelyants A., Apt A. Reactivation of dormant "non-culturable" *Mycobacterium tuberculosis* developed in vitro after injection in mice: Both the dormancy depth and host genetics influence the outcome. *Microbial Pathogenesis*. 2015; 78: 63–66. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.11.016>
- Демкина Г. Р., Шлеева М. О., Багаева Д. И., Вострокнутова Г. Н., Капрелянц А. С. Выявление «некультивируемых» клеток *Mycobacterium tuberculosis* культуральными методами. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2023; 59 (3): 244–252. <https://doi.org/10.31857/S0555109923020058>
- Shleeva M. O., Bagramyan K., Telkov M. V., Mukamolova G. V., Young M., Kell D. B., Kaprelyants A. S. Formation and resuscitation of "non-culturable" cells of *Rhodococcus rhodochrous* and *Mycobacterium tuberculosis* in prolonged stationary phase. *Microbiology*. 2002; 148 (5): 1581–1591. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-5-1581>
- Kaprelyants A. S., Gottschal J. C., Kell D. B. Dormancy in non-sporulating bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 1993; 10 (3–4): 271–285. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb05871.x>
- Chao M. C., Rubin E. J. Letting sleeping dogs lie: does dormancy play a role in tuberculosis? *Annual Review of Microbiology*. 2010; 64: 293–311. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134043>
- Ионина С. В., Донченко А. С., Гусельникова Е. П., Гордеева Е. И. Микробиологическое и генетическое типирование атипичных микобактерий, выявленных на территории Новосибирской области. *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*. 2024; 54 (8): 75–82. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2024-8-8>
- Nouioui I., Brunet L. R., Simpson D., Klenk H.-P., Goodfellow M. Description of a novel species of fast growing mycobacterium: *Mycobacterium kyogaense* sp. nov., a scotochromogenic strain received as *Mycobacterium vaccae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2018; 68 (12): 3726–3734. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003039>

REFERENCES

- Kurilova A. E., Lebedeva A. Yu., Bogun A. G. Accumulation of mutations in the genomes of microorganisms during long-term storage and cultivation. *Bacteriology*. 2021; 6 (4): 84–93. <https://elibrary.ru/hcbaqs> (in Russ.)
- Blevins S. M., Bronze M. S. Robert Koch and the 'golden age' of bacteriology. *International Journal of Infectious Diseases*. 2010; 14 (9): e744–e751. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.12.003>
- Van Hop D. Establishment and management of culture collections of microorganisms (mbrc): an overview. In: *Microbial Resource Conservation: Conventional to Modern Approaches*. Eds. S. K. Sharma, A. Varma. Cham: Springer; 2018; Chapter 3: 55–109. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96971-8_3
- Markin V. A. Collections of pathogenic viruses for addressing general biologic problems. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2007; (6): 84–93. <https://elibrary.ru/iisqft> (in Russ.)
- Onishchenko G. G., Kutyrev V. V., Osin A. V. Collection activities in the sphere of pathogenic microorganisms usage for the provision of biological safety in the Russian Federation. *Infectious Diseases: News, Opinions, Training*. 2016; (1): 37–46. <https://elibrary.ru/vretot> (in Russ.)
- Morgan C. A., Herman N., White P. A., Vesey G. Preservation of microorganisms by drying: a review. *Journal of Microbiological Methods*. 2006; 66 (2): 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>
- Sidorchuk A. A., Krasnova A. A. Preservation of bacterial cultures different groups after prolonged storage in a lyophilized condition. *Russian Veterinary Journal. Productive Animals*. 2016; (3): 22–25. <https://elibrary.ru/witnij> (in Russ.)
- Pennings L. J., Zweijpenning S., Ruth M. M., Wattenberg M., Boeree M. J., Hoefsloot W., van Ingen J. *Mycobacterium avium* complex bacteria remain viable in sputum during storage and refrigeration. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2018; 92 (4): 309–310. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.06.017>
- Griffith D. E., Adjemian J., Brown-Elliott B. A., Philley J. V., Prevots D. R., Gaston C., et al. Semiquantitative culture analysis during therapy for *Mycobacterium avium* complex lung disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2015; 192 (6): 754–760. <https://doi.org/10.1164/rccm.201503-0444OC>
- Umpeleva T. V., Eremeeva N. I., Vakhrusheva D. V. Development of technology for long-term storage of *Mycobacterium tuberculosis* cultures. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2021; 23 (4): 404–408. <https://doi.org/10.36488/cmhc.2021.4.404-408> (in Russ.)
- Kishilova S. A., Leonova V. A., Mitrova V. A., Rozhkova I. V. Basic methods of preserving the viability and properties of microorganisms at different storage times: a review. *Food Industry*. 2025; 2: 78–84. <https://doi.org/10.52653/PPI.2025.2.2.016> (in Russ.)
- Kwon B. S., Park J. S., Shin J.-A., Kim E. S., Lim S. Y., Song M. J., et al. A prospective study on the long-term storage of sputum and the recovery of nontuberculous mycobacteria. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*. 2023; 17:17534666231162244. <https://doi.org/10.1177/17534666231162244>

13. Mulyukin A. L., Demkina E. V., Kryazhevskikh N. A., Galchenko V. F., El-Registan G. I., Suzina N. E., et al. Dormant forms of *Micrococcus luteus* and *Arthrobacter globiformis* not platable on standard media. *Microbiology*. 2009; 78 (4): 407–418. <https://doi.org/10.1134/S0026261709040031>
14. Oliver J. D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 2010; 34 (4): 415–425. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x>
15. Oliver J. D. The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology*. 2005; 43 (Sp): 93–100. <https://www.jmicrobiol.or.kr/upload/pdf/jm-43-1-93.pdf>
16. Shleeva M., Kondratieva T., Rubakova E., Vostroknutova G., Kaprelyants A., Apt A. Reactivation of dormant “non-culturable” *Mycobacterium tuberculosis* developed *in vitro* after injection in mice: Both the dormancy depth and host genetics influence the outcome. *Microbial Pathogenesis*. 2015; 78: 63–66. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.11.016>
17. Demina G. R., Shleeva M. O., Bagaeva D. I., Vostroknutova G. V., Kaprelyants A. S. Detection of “non-culturable” *Mycobacterium tuberculosis* cells by cultural methods. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2023; 59 (3): 244–252. <https://doi.org/10.31857/S0555109923020058> (in Russ.)
18. Shleeva M. O., Bagryan K., Telkov M. V., Mukamolova G. V., Young M., Kell D. B., Kaprelyants A. S. Formation and resuscitation of “non-culturable” cells of *Rhodococcus rhodochrous* and *Mycobacterium tuberculosis* in prolonged stationary phase. *Microbiology*. 2002; 148 (5): 1581–1591. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-5-1581>
19. Kaprelyants A. S., Gottschal J. C., Kell D. B. Dormancy in non-sporulating bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 1993; 10 (3–4): 271–285. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb05871.x>
20. Chao M. C., Rubin E. J. Letting sleeping dogs lie: does dormancy play a role in tuberculosis? *Annual Review of Microbiology*. 2010; 64: 293–311. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134043>
21. Ionina S. V., Donchenko A. S., Guselnikova E. P., Gordeeva E. I. Microbiological and genetic typing of atypical *Mycobacteria* identified in the Novosibirsk region. *Siberian Herald of Agricultural Science*. 2024; 54 (8): 75–82. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2024-8-8> (in Russ.)
22. Nouioui I., Brunet L. R., Simpson D., Klenk H.-P., Goodfellow M. Description of a novel species of fast growing mycobacterium: *Mycobacterium kyogaense* sp. nov., a scotochromogenic strain received as *Mycobacterium vaccae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2018; 68 (12): 3726–3734. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003039>

Поступила в редакцию / Received 20.05.2026

Поступила после рецензирования / Revised 29.06.2026

Принята к публикации / Accepted 24.07.2026

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ионина Светлана Владимировна, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории туберкулеза сельскохозяйственных животных ИЭВСиДВ СФНЦА РАН, р. п. Краснообск, Новосибирская обл., Россия; <https://orcid.org/0000-0001-5912-8904>, labtub@mail.ru

Svetlana V. Ionina, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Tuberculosis of Farm Animals, Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East, Krasnoobsk, Novosibirsk Oblast, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-5912-8904>, labtub@mail.ru

Гордеева Елизавета Игоревна, младший научный сотрудник бактериологической лаборатории ФГБУ «ННИИТ» Минздрава России, г. Новосибирск, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-3288-5259>, mbtnniit20@gmail.com

Elizaveta I. Gordeeva, Junior Researcher, Bacteriological Laboratory, Novosibirsk Tuberculosis Research Institute of the Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-3288-5259>, mbtnniit20@gmail.com

Вклад авторов: Ионина С. В. – формулировка основной идеи, анализ литературных данных, оформление текста статьи, составление графика и таблицы, анализ полученных результатов; Гордеева Е. И. – осуществление молекулярно-биологических и молекулярно-генетических исследований.

Contribution of the authors: Ionina S. V. – formulation of the main concept, published data analysis, text formatting, preparation of graphs and tables, interpretation of obtained results; Gordeeva E. I. – conducting molecular biological and molecular genetic studies.



<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-303-312>
УДК 619:578.5:599.4



Подходы определения генетической последовательности РНК-содержащих вирусов из биологического материала с низкой копийностью на примере вирусов летучих мышей

К. А. Столбунова¹, М. А. Степанюк¹, А. Д. Мошкин¹, И. В. Попов², О. В. Охлопкова¹

¹ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Научно-исследовательский институт вирусологии (НИИ вирусологии ФИЦ ФТМ), ул. Тимакова, 2, г. Новосибирск, 630060, Россия

² ФГОУ ВО «Донской государственный технический университет» (ДГТУ), пл. Гагарина, 1, г. Ростов-на-Дону, 344000, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Летучие мыши, являясь природным резервуаром множества вирусов, традиционно воспринимаются как источник биологической опасности. Активное развитие центров реабилитации рукокрылых входит в противоречие с их репутацией высокопотенциальных резервуаров зоонозных инфекций: концентрация животных в условиях центра без должного контроля способна искусственно усиливать циркуляцию патогенов. Разрешить это противоречие можно путем включения в протоколы работы центров предварительного вирусологического скрининга поступающих особей. Выявление носителей и их своевременная изоляция (карантин) защитят как остальных животных, так и персонал, а накопленные данные позволят создать систему раннего предупреждения о появлении новых генетических вариантов вирусов.

Цель исследования. Апробация комбинированного подхода к получению полногеномных последовательностей РНК-содержащих вирусов рукокрылых в условиях низкой копийности и фрагментации РНК-матрицы, включающего последовательное применение и модификацию методов ампликонного секвенирования и случайного прайминга (SMART-9N).

Материалы и методы. В качестве материала исследования были взяты образцы фекалий летучих мышей, содержащихся в условиях реабилитационного центра в г. Ростове-на-Дону в 2022–2023 гг. В статье описана последовательность действий от выделения нуклеиновых кислот до обработки и анализа данных. Также представлены три способа обогащения РНК-матрицы на основе реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции.

Результаты. При проведении исследования была разработана праймерная панель для выявления альфа-коронавирусов летучих мышей. В результате метагеномного анализа установлено присутствие вирусной РНК *Bat batrovirus* (семейство *Astroviridae*) и разработаны диагностические праймеры для подтверждения. Получена полная генетическая последовательность вируса *Loanvirus brunaense* (семейство *Hantaviridae*) и 95% нуклеотидной последовательности вируса *Alphacoronavirus* (семейство *Coronaviridae*).

Заключение. Данные о генетических последовательностях вирусов играют важную роль в различных аспектах науки, медицины, ветеринарии и здравоохранения в целом. Результаты данного исследования могут быть использованы для разработки экспресс-диагностических тест-систем по обнаружению различных вирусов летучих мышей.

Ключевые слова: секвенирование нового поколения, NGS, секвенирование, РНК-вирусы, летучие мыши, пробоподготовка

Благодарности: Исследование выполнено при поддержке гранта РФ № 23-64-00005 и государственного задания НИИ вирусологии ФИЦ ФТМ № 125031903984-1.

Для цитирования: Столбунова К. А., Степанюк М. А., Мошкин А. Д., Попов И. В., Охлопкова О. В. Подходы определения генетической последовательности РНК-содержащих вирусов из биологического материала с низкой копийностью на примере вирусов летучих мышей. *Ветеринария сегодня*. 2026; 15 (3): 303–312. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-303-312>

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Столбунова Кристина Александровна, младший научный сотрудник лаборатории геномики и эволюции вирусов НИИ вирусологии ФИЦ ФТМ, ул. Тимакова, 2, г. Новосибирск, 630060, Россия, kristina.sunwo@yandex.ru

Approaches to determining the genetic sequence of RNA viruses from low-copy biological material, using bat viruses as a model

Kristina A. Stolbunova¹, Marina A. Stepanyuk¹, Alexey D. Moshkin¹, Igor V. Popov², Olesia V. Ohlopkova¹

¹ Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Research Institute of Virology, ul. Timakova, 2, Novosibirsk 630060, Russia

² Don State Technical University, pl. Gagarina, 1, Rostov-on-Don 344000, Russia

ABSTRACT

Introduction. Bats are recognized as natural reservoirs for a wide range of viruses and are therefore traditionally viewed as a potential biological hazard. This perception, however, conflicts with the growing operation of bat rehabilitation centers, where the concentration of animals – if not accompanied by rigorous

virological monitoring – may inadvertently facilitate pathogen transmission. A viable resolution lies in integrating preliminary virological screening into standard intake protocols. Early identification of viral carriers and their timely quarantine would not only protect both animal cohorts and center personnel but also generate valuable surveillance data to support early warning systems for emerging viral genetic variants.

Objective. To validate a combined methodological approach for reconstructing full-genome sequences of bat-derived RNA viruses under conditions of low viral load and fragmented RNA templates. The proposed strategy involves the sequential application and adaptation of amplicon-based sequencing and random priming (SMART-9N) techniques.

Materials and methods. Fecal samples were collected from bats housed at a rehabilitation center in Rostov-on-Don between 2022 and 2023. The manuscript details the complete workflow, from nucleic acid extraction through to bioinformatic data processing and analysis. Three RNA template enrichment strategies based on reverse transcription and PCR are also described and compared.

Results. A primer panel was developed specifically for the detection of bat alphacoronaviruses. Metagenomic analysis further revealed the presence of viral RNA corresponding to *Bat astrovirus* (family *Astroviridae*), for which confirmatory diagnostic primers were subsequently designed. Notably, the complete genomic sequence of *Loanvirus brunaense* (family *Hantaviridae*) was obtained, along with 95% of the nucleotide sequence of an *Alphacoronavirus* (family *Coronaviridae*).

Conclusion. Viral genetic sequence data are indispensable across diverse fields, including fundamental science, clinical medicine, veterinary practice, and public health. The findings of this study provide a practical foundation for the development of rapid diagnostic test kits aimed at detecting bat-associated viruses.

Keywords: next generation sequencing, NGS, sequencing, RNA viruses, bats, sample preparation

Acknowledgments: The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 23-64-00005 and the state assignment of the Research Institute of Virology of the FRC FTM No. 125031903984-1.

For citation: Stolbunova K. A., Stepanyuk M. A., Moshkin A. D., Popov I. V., Ohlopko O. V. Approaches to determining the genetic sequence of RNA viruses from low-copy biological material, using bat viruses as a model. *Veterinary Science Today*. 2026; 15 (3): 303–312. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-303-312>

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

For correspondence: Kristina A. Stolbunova, Junior Researcher, Laboratory of Genomics and Evolution of Viruses, Research Institute of Virology, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, ul. Timakova, 2, Novosibirsk 630060, Russia, kristina.sunwo@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ

Рукокрылые (*Chiroptera*) – одна из самых уязвимых и наименее изученных групп млекопитающих в России, находящаяся на стыке интересов экологии, ветеринарии и эпидемиологии. Летучие мыши признаны уникальными резервуарами для огромного разнообразия РНК-содержащих вирусов, многие из которых обладают значительным зоонозным потенциалом [1, 2, 3]. Изучение их генетического разнообразия является ключом к пониманию эволюции вирусов, экологии инфекционных болезней и прогнозированию пандемических угроз [4]. Однако прямая расшифровка вирусных геномов из биологических образцов (слюны, фекалий, тканей) часто сталкивается с критическим препятствием – крайне низкой вирусной нагрузкой. Ограниченное количество вирусных копий, фрагментированная РНК, высокий уровень примесей нуклеиновых кислот хозяина и сложность выделения делают традиционные методы секвенирования малоэффективными [5, 6].

Нарастающая антропогенная активность, приводящая к интенсификации контактов с популяциями рукокрылых, формирует прямые предпосылки для межвидовой передачи патогенов – как непосредственно человеку, так и опосредованно через промежуточных хозяев (домашних животных и сельскохозяйственный скот) [7, 8, 9]. Тем не менее механизмы и движущие факторы данного процесса остаются недостаточно изученными, что актуализирует необходимость применения междисциплинарных исследовательских подходов [10, 11].

В последние годы в России формируются центры реабилитации рукокрылых, что обусловлено совокупностью социальных, экологических и законодательных факторов. Ключевой причиной является рост

экологической грамотности населения: благодаря просветительской работе ученых и зоозащитников летучие мыши все чаще воспринимаются не как вредители, а как полезные и уязвимые животные, нуждающиеся в защите¹. Важную роль играет и правовой аспект: многие виды рукокрылых на территории страны занесены в региональные Красные книги, что законодательно обязывает оказывать им помощь². Реабилитационные центры для летучих мышей представляют собой специализированные учреждения, основная цель которых заключается в спасении, лечении и последующем возвращении в естественную среду рукокрылых, оказавшихся в бедственном положении. Их деятельность носит комплексный характер и включает несколько ключевых направлений. Прежде всего, это выхаживание осиротевших детенышей, оставшихся без матери вследствие разрушения убежищ или гибели взрослых особей [12]. Не менее важной задачей является лечение травм, наиболее распространенными из которых являются повреждения крыльев, полученные при столкновении с окнами, нападениях домашних животных или запутывании в садовых сетках. Центры также оказывают помощь истощенным и обезвоженным животным, особенно в критические периоды после спячки или при дефиците кормовой базы, занимаются диагностикой и терапией заболеваний. Важнейшим этапом является реабилитация перед выпуском, когда животные содержатся в специальных подготовительных вольерах для восстановления мышечной массы

¹ Сайт Российского отделения Союза охраны летучих мышей. <https://zmmu.msu.ru/bats/popular/populyar.htm>

² О животном мире: федеральный закон от 24.04.1995 № 52-ФЗ. https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_6542

и охотничьих навыков [13, 14]. Роль ветеринарных специалистов в работе таких центров является фундаментальной и критически важной, хотя их участие может иметь разные организационные формы. Крупные и хорошо финансируемые организации могут иметь в штате ветеринара, специализирующегося на экзотических животных или дикой природе. Однако более распространенной моделью является партнерство с курирующим ветеринаром, который осуществляет профессиональный надзор на волонтерской или договорной основе.

Предполагается, что ключевым аспектом в понимании формирования межвидовой передачи патогенов являются уникальные экологические характеристики отряда рукокрылых [15]. В отличие от прочих млекопитающих сопоставимых размерных классов, эти животные отличаются выраженной мобильностью, сложной социальной организацией, исключительной продолжительностью жизни и репродуктивной стратегией, сочетающей низкую плодовитость с высокой выживаемостью [16]. Существенные внутри- и межвидовые вариации в миграционном поведении, степени колоничности и склонности к впадению в состояние оцепенения с высокой вероятностью детерминируют формирование специфических адаптаций к патогенной нагрузке [17].

Значительную долю среди возникающих зоонозов, ассоциированных с рукокрылыми, составляют РНК-содержащие вирусы. Эти вирусы обладают высокой изменчивостью и быстрой способностью к накоплению мутаций, что является следствием низкой точности репликации, обеспечиваемой РНК-зависимой РНК-полимеразой, что позволяет данным возбудителям быстро эволюционировать [18, 19].

Осуществление комплексных исследований по выявлению вирусов у рукокрылых сопряжено со значительными методологическими трудностями. Как отмечено в работах некоторых авторов [20, 21, 22, 23], к ним относятся: 1) необходимость сбора долгосрочных временных рядов данных для выявления циркулирующих вирусов; 2) высокая пространственно-временная вариабельность экологических и популяционных параметров (сезонность, миграции, плотность популяции), которая затрудняет планирование репрезентативного отбора проб; 3) низкая распространенность некоторых вирусов в популяции, что требует применения целевых схем отбора проб, больших объемов выборки и использования специализированных молекулярно-диагностических методик.

В данной статье рассматриваются современные стратегические подходы, позволяющие преодолеть эти барьеры: от целевого обогащения вирусных последовательностей и высокочувствительных протоколов обратной транскрипции с предварительной амплификацией до методов метагеномного секвенирования нового поколения и их оптимизации для работы с деградированной РНК. На примере вирусов летучих мышей была оценена эффективность трех методических подходов по критерию покрытия генома, а также исследована возможность их комбинации для достижения максимальной полноты сборки.

Целью данного исследования является апробация комбинированного подхода к получению полногеномных последовательностей РНК-содержащих вирусов рукокрылых в условиях низкой копияльности и фрагментации РНК-матрицы, включающего последовательное применение и модификацию методов ампликонного секвенирования и случайного прайминга (SMART-9N).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала исследования были взяты образцы фекалий летучих мышей. Отбор проб в популяции летучих мышей Ростовской области (Россия) проводился с ноября 2022 г. по март 2023 г. в Ростовском центре реабилитации летучих мышей (Донской государственный технический университет, г. Ростов-на-Дону). В исследование были включены летучие мыши четырех видов: рыжая вечерница (*Nyctalus noctula*), двухцветный кожан (*Vespertilio murinus*), нетопырь Куля (*Pipistrellus kuhlii*) и поздний кожан (*Eptesicus serotinus*). Все летучие мыши были первоначально отобраны волонтерами Ростовского центра реабилитации летучих мышей по запросам жителей города с ноября 2022 г. по март 2023 г. Собранные колонии и отдельные летучие мыши были доставлены в центр реабилитации для ветеринарного осмотра и ухода. Каждый вид содержался коллективно, по 5–20 особей в клетке, что позволяло социализировать их во время реабилитации и способствовало спячке. Летучих мышей, находящихся в центре, кормили зофобасами и мучными червями. В конце ноября 2022 г. их поместили в контролируемую спячку при постоянной температуре 10 °C, и они оставались в спячке до начала апреля 2023 г. В мае 2023 г. здоровых летучих мышей выпустили в дикую природу, а летучих мышей, нуждающихся в дальнейшей реабилитации, выпустили позже. Образцы фекалий, каждый не менее 0,5 г, собирали из ящиков, в которых содержались зимующие летучие мыши (один раз из каждого ящика). Образцы хранились при минус 80 °C.

Также в данной статье рассмотрены подходы работы с положительными на коронавирус и хантавирус образцами, отобранными у особей рыжей вечерницы данной выборки в результате первичного скрининга, описанного в предыдущих работах авторов [24, 25]. На рисунке 1 изображена общая схема реализуемого исследования.

Выделение нуклеиновых кислот. С помощью ватного зонда образцы фекалий массой 20–50 мг помещали в микропробирки объемом 1,5 мл, добавляли 500 мкл стерильного фосфатно-солевого буфера и растирали содержимое до однородности ватным зондом. После этого образцы тщательно перемешивали с помощью вортекса. Далее центрифугировали образцы при 8000 rcf в течение 4 мин; 100 мкл надосадочной жидкости перемещали в новые пробирки объемом 1,5 мл и использовали для выделения нуклеиновых кислот согласно рекомендациям производителя набора «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).

Диагностические праймеры. В рамках данного исследования были сконструированы две пары праймеров для вложенной полимеразной цепной реакции (ПЦР) для выявления вирусов рода *Bastrovirus* семейства *Astroviridae* (табл. 1). Подбор осуществлялся на основе 60 референсных последовательностей бастровирусов из базы данных GenBank, обнаруженных среди летучих мышей и грызунов.

Подготовка кДНК по методике SMART-9N. Для синтеза кДНК использовали набор «Обратная транскриптаза RNAscribe RT» (ООО «Биолабмикс», Россия) и 2 праймера с одинаковыми свободными участками для следующего этапа обогащения. Один праймер на 3'-конце содержит 9N последовательность [AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACNNNNNNNN]. Второй праймер имеет три рибонуклеотидных гуанина [GCTAATCATTGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATrGrGrG] на 3'-конце [26]. К 10 мкл выделенной РНК добавляли по 1 мкл каждого

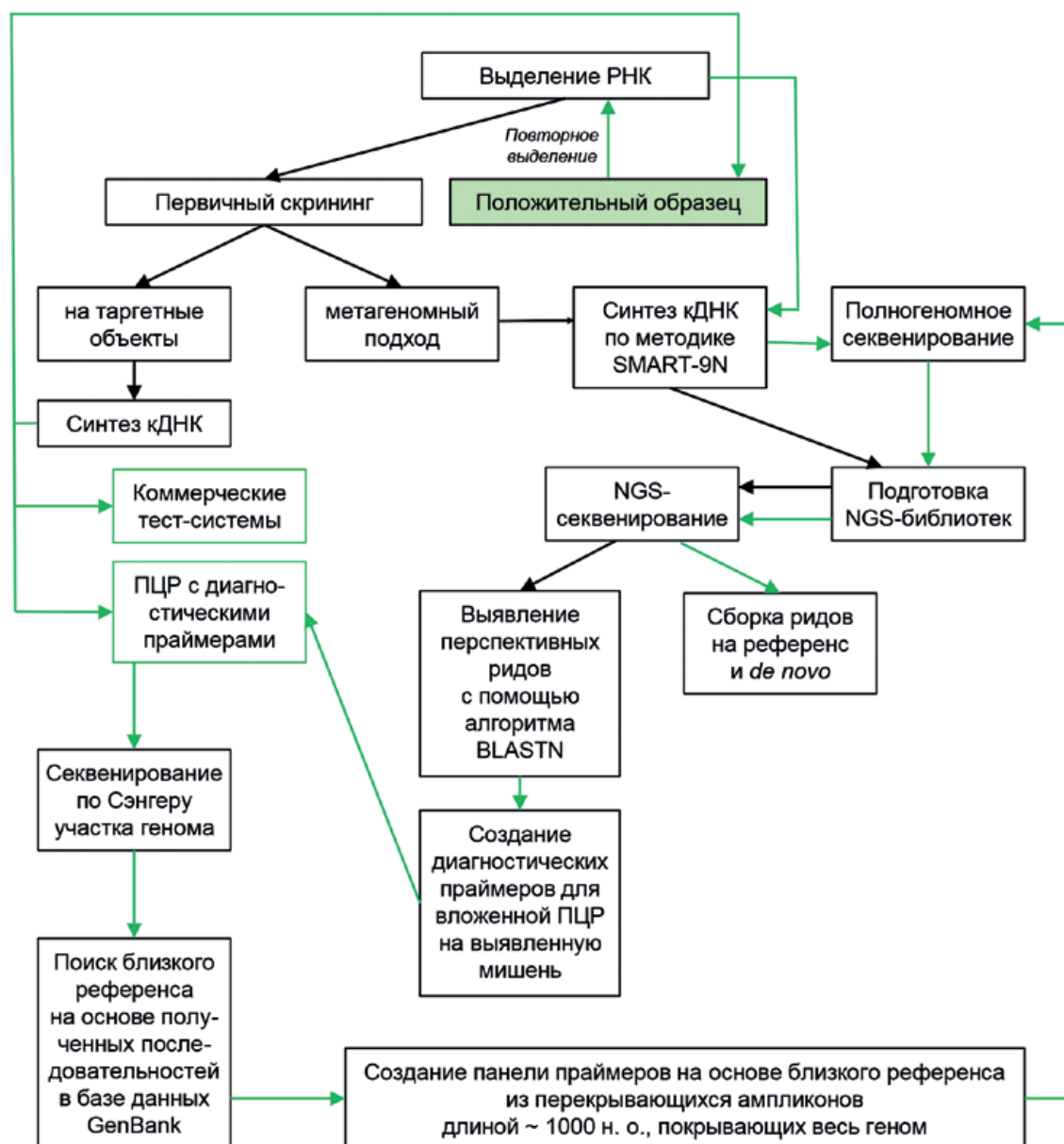


Рис. 1. Общая схема применения подходов по выявлению нуклеотидных последовательностей РНК-содержащих вирусов с низкой копиюностью (черными стрелками показаны пути скрининга по выявлению положительных образцов; зеленые стрелки отражают движение работы с положительными образцами)

Fig. 1. Overview of the methodological approaches for detecting nucleotide sequences of low-copy RNA viruses (black arrows indicate screening pathways for positive sample identification; green arrows trace the handling and processing workflow for positive samples)

Таблица 1
Диагностические праймеры для выявления вирусов вида *Bastrovirus* рукокрылых

Table 1
Diagnostic primers for the detection of bat batroviruses

Название	Последовательность 5'–3'	Температура отжига	Длина участка
Bastro F1	CACGAGAAGRAYCCCGACCT	58 °C	896 bp
Bastro R1	CCCACGCACCGTTTCAGRTC	57 °C	
Bastro F2 (st2)	TCAAGGCAGGGCARGGCAT	57 °C	408 bp
Bastro R2 (st2)	AACAGGGTGTGGCCTCGCC	57 °C	

Таблица 2

Панель праймеров, покрывающая весь геном альфа-коронавируса на основе референса OP919651.1

Table 2

Primer panel covering the complete genome of *Alphacoronavirus* based on reference sequence OP919651.1

Пул праймеров 1 (нечетные)		Пул праймеров 2 (четные)	
Название	Последовательность 5'–3'	Название	Последовательность 5'–3'
BtCoV_1F	TATCTATCTACGGATAGTGCGTCTCA	BtCoV_2F	GTGGCTGGTGAACCTAAATGCAAT
BtCoV_1R	GTGTGGAACCACAATTACACTTAATGAG	BtCoV_2R	GAGTGRACCAAGAACAATACTTACG
BtCoV_3F	GCCACTTGTGATTCTGTACGTGTT	BtCoV_4F	CAGGTGGCTTCTAGCCAGTT
BtCoV_3R	CTTTGACACCATAATAGCAAGAGCC	BtCoV_4R	GACGCCACCCAGCAATTATTCTG
BtCoV_5F	CCTGTTGATGAGTCCAATCTGCTG	BtCoV_6F	GAGAATCTTGCTCATGGTGGTGG
BtCoV_5R	GTTTGCCATTACGTGGTCCAACAA	BtCoV_6R	GGGTTCTGCTTTGTATACCTTGC
BtCoV_7F	GTACAGGCTGAATTGGTTTCTTATCTG	BtCoV_8F	GGYGAGCCTAGTGACTCTGAG
BtCoV_7R	CAATGACGACTGGTGTGCTACTA	BtCoV_8R	GTGCTGCCAAACAACCTTAGTATG
BtCoV_9F	CCTGTTGGCGATCCATTATGCG	BtCoV_10F	CTCACTCAGATTAAGAAGCTGTG
BtCoV_9R	GTAGTACACTTGAGAGGTCTTAC	BtCoV_10R	GTACACGCGCAGTAAAGATGC
BtCoV_11F	GTAATCTGATGARGCTCGCAC	BtCoV_12F	GCCCTCTTGAGTTGTGCTT
BtCoV_11R	GGAGATAGAATTGACCAACGCTC	BtCoV_12R	CTTGAACCTAAGCCACCAATTGCATC
BtCoV_13F	CTCTGTTGTACGTTGGTAGTG	BtCoV_14F	CTATCTCTATGTTGATGCCCTTG
BtCoV_13R	CATCAAGTAGCACAACACACACC	BtCoV_14R	CTGGGATRACTGATAAAGGTACAG
BtCoV_15F	GCTGCAGCCCAATGTACAAGAG	BtCoV_16F	GCATGGCTGAACCAATGGTGC
BtCoV_15R	GGATCTTGTGTACCTATAGGCACC	BtCoV_16R	GCAATTTGTGAGTCCCAATACAGG
BtCoV_17F	GTGTTGGGTGTCGTGACTC	BtCoV_18F	CTACGAGGGAGGTTGTATCACAG
BtCoV_17R	GTCATAGTGGYAGGATGTACGC	BtCoV_18R	GTTGAGAACAGAATTCATGTGGGC
BtCoV_19F	CTGTGATGATGGTGTGTTTGC	BtCoV_20F	GGCTCACTGATGTGAAGAC
BtCoV_19R	GTATAGTAGCATGCATAGGATGAC	BtCoV_20R	CTGGCTTAATAGCACATGCGC
BtCoV_21F	CAGAGGGTCAGCTTTAGACATATTG	BtCoV_22F	GTAATCGCATTTTGCYATGCG
BtCoV_21R	CAGCCTTCTGGCCTAACAACG	BtCoV_22R	GGACCTACCTAGTGTCAAACC
BtCoV_23F	CCTACCAAGACTAACGTTAAGTGC	BtCoV_24F	GATGGCGATGTGCACACTTT
BtCoV_23R	CTTCATGRGTAGAACTGGTACAC	BtCoV_24R	GTCGCTGACATGTCATTCAGG
BtCoV_25F	CCTCATCATGCGTGTGTRCAC	BtCoV_26F	GTCAACACGACGAAATGAGAGTGG
BtCoV_25R	CACACCAACATGGAAGCCRTAC	BtCoV_26R	CATCATAAGAGGCAGGAGGATCAC
BtCoV_27F	CCAGTCCACTACTGGTGGTTG	BtCoV_28F	GCAAGTGTCCCTTCACACCAC
BtCoV_27R	CACCYGTAACAACATCACCCTAG	BtCoV_28R	GTCTTCATCCACAGTCCGAG
BtCoV_29F	GCTCACTGTTTCTGAAGAGGCC	BtCoV_30F	GGTGATCAGATCTTCTCCATAGTG
BtCoV_29R	CTAAACATGACAAGGCCAGGTTC	BtCoV_30R	GTGCAGCTACAGAGCAATTAG
BtCoV_31F	CYAACTGTCTAATGATGCTGTAG	BtCoV_32F	GCCAATTGGAGCTATGATGGGG
BtCoV_31R	CAARATGACATCCACGAGAARTTC	BtCoV_32R	CTGTGCCGAGGTAGTAGA AATGC
BtCoV_33F	CTTCATATGATGCTGACWCAG	BtCoV_34F	CTCCAACACCCGCTGCATTGC
BtCoV_33R	GTTGAGGAGCTGGGATTTCG	BtCoV_34R	GTGATATAGTAATATCTTCTGCACTG

праймера в концентрации 10 и 30 рмоль/мкл соответственно. Полученную смесь поместили в амплификатор с температурным режимом 25 °C – 2 мин, 70 °C – 3 мин. Во время инкубации подготовили второй микс с использованием набора для обратной транскрипции: к 4 мкл «5× ОТ-буфер-mix» добавили 1 мкл «RNAscribe RT ревертазы» и 3 мкл воды для ПЦР. После окончания инкубации матрицы и праймеров к полученной смеси добавили приготовленный микс из буфера, фермента и воды, перемешали и снова поместили в амплификатор с температурным режимом 25 °C – 10 мин, 42 °C – 3 ч, 85 °C – 5 мин. По завершении программы синтез кДНК закончен и полученный продукт можно использовать для последующего ПЦР-обогащения.

Для наработки продукта на матрице кДНК применяли метод ПЦР-амплификации с использованием готовой ПЦР-смеси «БиоМастер LR HS-ПЦР (2×)» (ООО «Биолабмикс», Россия). Для приготовления ПЦР-микса использовали 15 мкл «БиоМастер LR HS-ПЦР (2×)» из набора, 4 мкл воды для ПЦР и 1 мкл праймера [AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT] в концентрации 30 рмоль/мкл и 10 мкл матрицы (кДНК, полученной по методике SMART-9N) [26]. Протокол амплификации состоял из следующих стадий: 1) предварительный нагрев – 95 °C, 5 мин; 2) 50 циклов амплификации, включающих этапы: денатурации – 94 °C, 15 с; отжига – 62 °C, 45 с; элонгации – 68 °C, 4 мин и 30 с; 3) заключительная элонгация – 68 °C, 15 мин. Синтез праймеров осуществляла компания

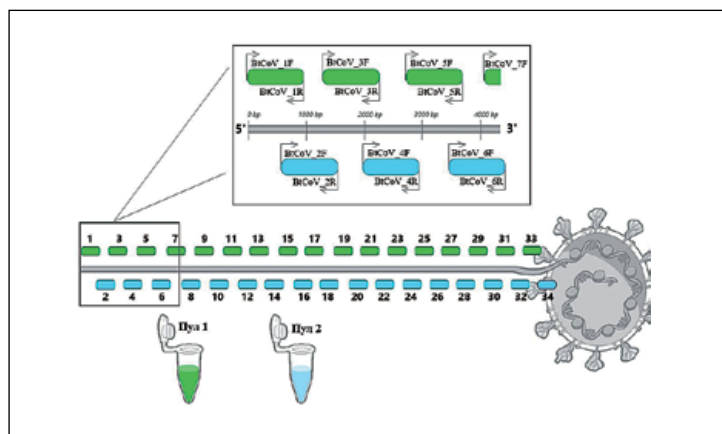


Рис. 2. Схема праймерной панели для покрытия генома коронавируса (голубым цветом отмечены четные участки, зеленым – нечетные)

Fig. 2. Schematic layout of the primer panel for coronavirus genome coverage (even-numbered amplicons are shown in blue; odd-numbered amplicons are shown in green)

ООО «Синтол» (Россия). Используемый амплификатор T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, США).

Праймерная панель, рассчитанная на основе близкого референса альфа-коронавируса летучих мышей. Как уже было сказано выше, ранее авторам удалось обнаружить с помощью диагностических праймеров фрагмент альфа-коронавируса у рыжей вечерницы [24]. Чтобы добиться большего охвата генома коронавируса с помощью метода секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS), была разработана панель олигонуклеотидов на основе максимально близкого референса *Alphacoronavirus* [GenBank OP919651.1] (табл. 2, рис. 2). Синтезированные праймеры охватывают фрагменты генома коронавируса в пределах 1000 пар оснований с перекрытием четных и нечетных участков. Каждый праймер разводили до концентрации 100 мкМ. Формировали 2 пула праймеров по 1 мкл каждого в соответствии с таблицей 1. Сформированные пулы разводили до рабочей концентрации 10 мкМ. Для амплификации целевых фрагментов полноразмерного генома была проведена одноступенчатая ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с использованием набора «БиоМастер ОТ-ПЦР-Премиум (2x)» (ООО «Биолабмикс», Россия). ПЦР-смесь готовили согласно инструкции производителя без учета праймеров и делили поровну на две части. В первую смесь добавляли 2,5 мкл пула нечетных праймеров, во вторую смесь – 2,5 мкл пула четных праймеров в концентрации 10 мкМ. Синтез праймеров осуществляла компания ООО «Биолабмикс» (Россия).

Модификация методики SMART-9N. Для модификации методики SMART-9N изменения внедрили только в конструкцию праймера, в составе которого присутствует последовательность 9N. Авторами была заменена последовательность 9N на последовательность известной части генома коронавируса на краю уже известного (отсеквенированного) участка на 5'-конце (табл. 3). Таким образом, при синтезе кДНК праймер должен селективно присоединяться к геному коронавируса и в процессе синтеза в сторону 5'-конца синтезировать матрицу кДНК неизвестного участка. Технически процесс синтеза и амплификации аналогичен описанному в пункте «Подготовка кДНК по методике SMART-9N» раздела «Материалы и методы» данной статьи. Синтез кДНК с каждым праймером из таблицы 3 и ПЦР-амплификация проводились в отдельных пробирках, после чего объединялись и готовились для NGS-секвенирования. Синтез праймеров осуществляла компания ООО «Биолабмикс» (Россия).

Подготовка NGS-библиотек. Для ферментативной фрагментации и лигирования адаптера применяли наборы FTP Display и LIB Display (ООО «БиоЛинк», Россия). Очистку кДНК проводили с помощью магнитных частиц с использованием VANTS DNA Clean Beads (Vazyme, Китай). Концентрацию конечного библиотечного пула измеряли с помощью флуорометра Qubit (Thermo Fisher Scientific, США) с набором для анализа Equalbit 1x dsDNA HS Assay Kit (Vazyme, Китай). Контроль готовых библиотек осуществляли путем проведения количественной ПЦР с использованием набора реактивов NEBNext Library Quant Kit for Illumina (New England Biolabs, США) и амплификатора CFX 96 (Bio-Rad Laboratories, США). Геномные библиотеки были секвенированы на платформе Illumina MiSeq с использованием набора реагентов MiSeq v3 в течение 600 циклов и на платформе FASTASeq (GeneMind, Китай) с использованием набора реактивов FASTASeq 300 Sequencing Kit V2.0.

Биоинформатический анализ. Полученные данные секвенатора на первом этапе были подвергнуты таксономической классификации с использованием инструмента Kraken2 и стандартной референсной базы Viral. Параллельно для реконструкции геномных последовательностей была выполнена сборка *de novo* с использованием ассемблера MEGANIT с параметрами по умолчанию. Аннотация полученных контигов проводилась путем поиска гомологичных последовательностей с использованием алгоритма BLASTn и базы данных NT. Идентифицированные в результате этого анализа референсные геномы были отобраны для следующего этапа. Для формирования полногеномной консенсусной

Таблица 3
Праймеры для модификации методики SMART-9N

Table 3
Primers for SMART-9N protocol modification

Название	Последовательность 5'–3'	Позиции праймера Реф. OP919651.1
CovBat_12570(9N)	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACTTGGTTACA	12570–12578
CovBat_19269(9N)	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCAGACATC	19269–19277
CovBat_22561(9N)	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGGTGTGAAG	22561–22569
CovBat_25024(9N)	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATCATTAGA	25024–25032
CovBat_27460(9N)	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACACAGCAATG	27460–27468
CovBat_28088(9N)	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGTCAAACAT	28088–28096

последовательности данные, полученные в результате секвенирования, были картированы на выбранный референсный геном с использованием программы для выравнивания BWA-MEM, включенной в программный пакет UGENE.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявление нуклеотидной последовательности с помощью диагностических праймеров. Для проведения первичного скрининга образцов не всегда есть возможность применения коммерческих тест-систем, поскольку вирусы одного и того же рода и вида могут циркулировать у различных животных и при этом иметь генетические различия, индивидуальные для определенного круга носителей. Диагностические праймеры подбираются на консервативные участки вирусного генома среди анализируемого круга носителей. Например, в предыдущей работе [24] авторы использовали диагностические праймеры для выявления вирусов семейства *Coronaviridae* у рукокрылых методом вложенной ПЦР. Это наиболее эффективный способ выявления нуклеотидной последовательности из биоматериала с поврежденной матрицей или низкой копийностью анализируемых объектов. К тому же данный подход позволяет проводить скрининг более селективно, если на первом шаге ПЦР вполне возможно, что праймеры могут комплементарно связываться с матрицей других представителей (хозяин, бактерии, насекомые и др.), то на втором шаге увеличивается вероятность обнаружения искомого объекта и возрастает число копий ампликонов, которых становится достаточно для последующего анализа.

При попытке получения полногеномной последовательности коронавирусовой РНК рукокрылых с применением методики SMART-9N для синтеза кДНК в данном исследовании этот подход оказался не вполне успешным, а сработал больше как метагеномный скрининг. В результате уже метагеномного анализа один из образцов, который был положительным на коронавирус рукокрылых (GenBank PQ439335), содержал в себе порядка сотни ридов нуклеотидных последовательностей, относящихся к вирусу семейства *Astroviridae*, к неклассифицируемым бастровирусам рукокрылых (*Bat bastrovirus*). Бастровирусы обнаружены у летучих мышей, грызунов, птиц, комаров, свиней и людей. Они были впервые выявлены в образцах кала человека на территории Нидерландов в 2016 г. Генетический анализ показал, что они имеют частичное сходство как с астровирусами, так и с вирусами гепатита E. На сегодняшний день их потенциальная роль в развитии болезней у человека не установлена [27].

Для подтверждения присутствия в образце РНК бастровируса были сконструированы диагностические праймеры на основе известных генетических последовательностей бастровирусов рукокрылых, выделенных на территории Евразии (табл. 1). Результат вложенной ПЦР оказался положительным. Продукты первого и второго шага были объединены и подготовлены для NGS-секвенирования, в результате которого было получено 711 н. о. *Bat bastrovirus* (GenBank PX666685). В 2023 г. на территории России в Московской области Г. В. Роевым и соавт. у рыжей вечерницы также был обнаружен бастровирус [28], что может свидетельствовать о видоспецифичности вируса к носителю. Авторы оценили степень зоонозного риска обнаруженного вируса с помощью машинного обучения и выявили для одного из образцов высокий зоонозный потенциал. Важно отметить, что полученная нами последовательность бастровиру-

са охватывает лишь фрагмент ORF1. Для полноценной филогенетической классификации этого вируса требуется получение более длинных нуклеотидных последовательностей, что упирается в те же проблемы низкой копийности и фрагментации, которые являются предметом нашего исследования. Несмотря на это, при сравнении обнаруженного нами участка гена PX666685 с московскими изолятами (OR552430 и OR552431) идентичность нуклеотидных оснований составила 97,19 и 97,33% соответственно. Данные о высоком зоонозном потенциале референсного изолята указывают на необходимость дальнейшего изучения выявленного бастровируса как потенциально способного к межвидовой передаче.

Комбинация методологических подходов позволила зафиксировать случай коинфекции (одновременного носительства двух и более вирусов) у рыжей вечерницы (*Alphacoronavirus* и *Bat bastrovirus*). Согласно систематическому обзору B. D. Jones et al., анализ 117 исследований выявил 61 публикацию, в которой описаны случаи вирусной коинфекции у 662 особей летучих мышей, что подтверждает распространенность этого явления, хотя оно чаще фиксируется как побочная находка, а не как цель специализированных работ [29], что и было установлено в нашем исследовании.

Полногеномная сборка после пробоподготовки кДНК по методике SMART-9N. Технология SMART – это механизм переключения на 5'-конце матрицы РНК. Метод базируется на способности определенных обратных транскриптаз переключать матрицы и включать адаптерные последовательности во время синтеза первой цепи кДНК [26]. Этот подход основан на случайном прайминге для синтеза кДНК и не является селективным. Зато данный метод вполне приемлем для метагеномного/полногеномного секвенирования или первичного скрининга.

Как уже было описано выше, в данном исследовании эта методика не подошла для выявления полногеномной последовательности коронавируса рукокрылых. Это могло произойти, вероятнее всего, из-за длины (32 000 н. о.) и структуры (линейный) его генома, а также количества и состояния матрицы в образце. Но этот подход хорошо сработал на примере сегментированного генома хантавируса рукокрылых (*Loanvirus brunaense*), у которого удалось собрать после NGS-секвенирования 3 полноразмерных кодирующих гена: S-сегмент длиной 1323 н. о. (GenBank PP898197.1), кодирующий белок нуклеокапсид; М-сегмент длиной 3427 н. о. (GenBank PP910333.1), кодирующий гликопротеины; L-сегмент длиной 6561 н. о. (GenBank PP910334.1), кодирующий РНК-зависимую РНК-полимеразу. Полученные нами результаты согласуются с данными I. M. Claro et al., которые впервые систематически охарактеризовали эффективность метода SMART-9N для метагеномного секвенирования РНК-вирусов. Авторы продемонстрировали, что данный подход обладает рядом важных преимуществ по сравнению с традиционными ампликонными методами [26]. В контексте нашего исследования эти данные имеют прямое значение. Успешная сборка трех полноразмерных сегментов хантавируса *Loanvirus brunaense* с использованием протокола SMART-9N подтверждает, что метод эффективен для сегментированных РНК-вирусов, в отличие от коронавируса с длинным не-сегментированным геномом, где тот же протокол оказался недостаточно эффективным. Геном хантавируса, каждый сегмент которого не превышает 6500 н. о., был

собиран полностью. Это наблюдение также согласуется с данными I. M. Claro et al., которые отмечали, что эффективность SMART-9N зависит от длины и структуры целевого генома. Таким образом, метод SMART-9N представляет собой ценный инструмент для метагеномного секвенирования РНК-вирусов, особенно в случаях, когда неизвестен точный вид, вирус имеет сегментированную структуру генома и требуется получение длинных ридов для *de novo* сборки. В то же время для длинных несегментированных геномов, таких как коронавирусы, может потребоваться дополнительная оптимизация протокола или комбинация с другими подходами, что будет рассмотрено далее в статье.

Праймерная панель, рассчитанная на основе близкого референса, на примере альфа-коронавируса летучих мышей. В результате ПЦР-амплификации с праймерной панелью было получено 2 пула ПЦР-продуктов, которые объединили и подготовили к NGS. При биоинформатической сборке данных секвенирования удалось покрыть более 30% генома альфа-коронавируса. Десять пар праймеров успешно отождествились на матрицу, и примерно 10 000 н. о. удалось прочитать, используя данный подход. Здесь большое значение имеет качество и целостность РНК-цепи. Каждая пара праймеров рассчитана примерно на 1000 букв. Такая длина наиболее оптимальна для того, чтобы в дальнейшем использовать ферментативную фрагментацию, в результате которой возможно получить средний фрагмент оптимальной длины, ориентированный на возможности чтения секвенатора и наборов реактивов для работы с ним. Если ампликоны будут меньшей длины, соответственно, при фрагментации могут получиться слишком короткие участки, которые либо удалятся при очистке на магнитных частицах, либо возникнут трудности при сборке коротких ридов. Сравнение с альтернативными подходами показывает, что праймерная панель, хотя и является экономически доступным методом, имеет фундаментальные ограничения. Во-первых, ампликонные методы критически зависят от точной комплементарности праймеров матрице, и даже единичные нуклеотидные замены в сайтах посадки могут приводить к выпадению ампликонов. Во-вторых, для РНК-вирусов с высокой частотой мутаций праймеры необходимо часто обновлять, чтобы они соответствовали циркулирующим вариантам [30]. В качестве альтернативы можно использовать более дорогостоящий метод гибридационного захвата (target capture sequencing), который содержит зонды, толерантные к нуклеотидным несовпадениям. Takemae N. et al. продемонстрировали, что при концентрации вирусной РНК < 26 копий/мкл target capture sequencing обеспечивает > 70% покрытия полноразмерных геномов, что представляет собой примерно 180-кратное увеличение числа ридов по сравнению с метагеномным секвенированием [30]. Таким образом, наш результат с низким покрытием (лишь 30% генома) при использовании праймерной панели является весьма распространенной проблемой и иллюстрирует ограничение ампликонных подходов в условиях фрагментированной РНК и возможных мутаций в праймерных участках.

Модификация методики SMART-9N для большего покрытия генома. В поисках новых вариантов для получения более полной нуклеотидной последовательности альфа-коронавируса летучих мышей была подготовлена кДНК по модифицированной методике протокола

SMART-9N. Условия ПЦР-амплификации оставались неизменными. Все ПЦР-продукты одного образца объединили и аналогичным образом подготовили NGS-библиотеку. После секвенирования при сборке ридов на референс покрытие генома составило уже около 80%, это примерно 25 000 н. о.

Оригинальный протокол SMART-9N, разработанный I. M. Claro et al., основан на использовании случайного 9N-праймера, что обеспечивает неселективную амплификацию всей РНК, присутствующей в образце. Однако, как отмечают сами авторы, метод имеет ограничения при работе с длинными несегментированными геномами: даже для SARS-CoV-2 максимальная длина единичного рида составила 18 500 п. о., что покрывает лишь 60% генома [26]. Данные ограничения обусловлены двумя факторами – это конкуренция с клеточной РНК и невозможность направленной достройки участков в сторону 5'-конца. Предложенная нами модификация устраняет оба этих ограничения. Замена случайного 9N-праймера на специфичный праймер, комплементарный уже известному участку генома коронавируса (на краю отсеквенированного участка), обеспечивает селективную амплификацию и направленный синтез кДНК в сторону 5'-конца генома, что позволяет достраивать неизвестные участки. В результате чего удалось увеличить покрытие генома с 30% (при использовании только праймерной панели) до 80%.

Объединение подходов SMART-9N и праймерной панели для альфа-коронавируса. После обработки результатов сборки альфа-коронавируса при индивидуальном секвенировании каждого из трех подходов была подготовлена новая NGS-библиотека, в которой в равных долях смешали продукты обогащения матрицы после протокола SMART-9N, модифицированного SMART-9N и праймерной панели в одну пробирку. В результате секвенирования одновременно трех подходов покрытие генома составило уже 95%, что соответствует примерно 26 500 нуклеотидам. Полученное нами покрытие генома после объединения трех подходов сопоставимо с результатами A. Cerro-Monje et al., которые достигли порога > 90% генома после объединения ридов из трех повторов [31]. Однако, в отличие от их подхода, основанного исключительно на повторных реакциях секвенирования одного типа, нами использована комбинация различных методов пробоподготовки (SMART-9N, модифицированный SMART-9N и праймерная панель), что позволило достичь 95% покрытия без многократного секвенирования одного и того же материала. Стоит отметить, что L. Marcolungo et al. [32] также подчеркивают важность комбинирования данных из нескольких источников (технических трехкратных повторов синтеза кДНК и ампликонов) для достижения полной реконструкции генома. Эта логика перекликается с нашим подходом, описанным выше. Эти две работы основаны на одном принципе: разные эксперименты дают разные наборы ампликонов, и их объединение позволяет закрыть пробелы в геноме, что подтверждает необходимость применения различных комбинаций в подобных условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования были апробированы три подхода к получению полногеномных последовательностей РНК-содержащих вирусов из образцов с низкой копийностью и фрагментированной РНК-матрицей (образцы от рукокрылых, поступающих в центр реабилитации).

Основные результаты:

1. С помощью методики SMART-9N в результате мета-геномного анализа была обнаружена РНК *Bat batrovirus* рукокрылых (семейство *Astroviridae*). Сконструированы диагностические праймеры для вложенной ПЦР. Выявленный участок гена длиной 711 н. о. запонирован в базу данных GenBank – PX666685.

2. Протокол SMART-9N в немодифицированном виде показал высокую эффективность для сегментированного генома хантавируса (собраны три полноразмерных кодирующих сегмента) и запонированы в базу данных GenBank: PP898197.1, PP910333.1, PP910334.1.

3. Созданная праймерная панель на основе близкого референсного генома альфа-коронавируса позволила покрыть лишь 30% целевого генома. Это подтверждает известное ограничение ампликонных методов: их эффективность критически зависит от комплементарности праймеров матрице и целостности РНК.

4. Модификация SMART-9N (замена случайного 9N-праймера на специфичный, комплементарный известному участку генома коронавируса) позволила увеличить покрытие до 80% за счет селективной амплификации вирусной РНК и направленного синтеза кДНК в сторону 5'-конца.

5. Комбинация трех подходов (SMART-9N + модифицированный SMART-9N + праймерная панель) в одной библиотеке для секвенирования обеспечила покрытие 95% генома альфа-коронавируса, что на 15% выше лучшего индивидуального результата.

В условиях низкой копийности и фрагментации РНК-матрицы ни один из апробированных методов по отдельности не обеспечивает полного покрытия генома альфа-коронавируса. Предложенная стратегия комбинации трех подходов позволяет компенсировать «слепые зоны» каждого метода и может быть рекомендована для секвенирования архивных и деградированных образцов, где переотбор материала невозможен.

Обнаружение в образцах от рукокрылых РНК бастровируса с 97%-й идентичностью зоонозному изоляту, а также коронавируса и хантавируса подтверждает необходимость вирусологического мониторинга в центрах реабилитации рукокрылых. Предложенный протокол может быть использован для скрининга и полногеномного секвенирования вирусов в подобных учреждениях при ограниченных ресурсах. Дальнейшие исследования будут направлены на доопределение оставшихся 5% генома и разработку специализированной праймерной панели для бастровируса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Nieto-Rabiela F., Wiratsudakul A., Suzán G., Rico-Chávez O. Viral networks and detection of potential zoonotic viruses in bats and rodents: a worldwide analysis. *Zoonoses and Public Health*. 2019; 66 (6): 655–666. <https://doi.org/10.1111/zph.12618>
2. Alvarez-Munoz S., Upegui-Porras N., Gomez A. P., Ramirez-Nieto G. Key factors that enable the pandemic potential of RNA viruses and inter-species transmission: a systematic review. *Viruses*. 2021; 13 (4):537. <https://doi.org/10.3390/v13040537>
3. Letko M., Seifert S. N., Olival K. J., Plowright R. K., Munster V. J. Bat-borne virus diversity, spillover and emergence. *Nature Reviews Microbiology*. 2020; 18 (8): 461–471. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0394-z>
4. Yan X., Liu Y., Hu T., Huang Z., Li C., Guo L., et al. A compendium of 8,176 bat RNA viral metagenomes reveals ecological drivers and circulation dynamics. *Nature Microbiology*. 2025; 10 (2): 554–568. <https://doi.org/10.1038/s41564-024-01884-7>
5. Greninger A. L. The challenge of diagnostic metagenomics. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2018; 18 (7): 605–615. <https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1487292>

6. Bergner L. M., Orton R. J., da Silva Filipe A., Shaw A. E., Becker D. J., Tello C., et al. Using noninvasive metagenomics to characterize viral communities from wildlife. *Molecular Ecology Resources*. 2019; 19 (1): 128–143. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12946>
7. Eby P., Peel A. J., Hoegh A., Madden W., Giles J. R., Hudson P. J., Plowright R. K. Pathogen spillover driven by rapid changes in bat ecology. *Nature*. 2023; 613 (7943): 340–344. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05506-2>
8. Wang J., Pan Y. F., Yang L. F., Yang W. H., Lv K., Luo C. M., et al. Individual bat virome analysis reveals co-infection and spillover among bats and virus zoonotic potential. *Nature Communications*. 2023; 14 (1):4079. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39835-1>
9. Tsai V., Lai Y.-C., Contreras G. P., Yeh T.-Y. Impact of anthropogenic activities on the ecosystem and emergence of bat-borne zoonotic diseases. *Virology*. 2026; 617:110811. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2026.110811>
10. Hayman D. T. S., Bowen R. A., Cryan P. M., McCracken G. F., O'Shea T. J., Peel A. J., et al. Ecology of zoonotic infectious diseases in bats: current knowledge and future directions. *Zoonoses and Public Health*. 2013; 60 (1): 2–21. <https://doi.org/10.1111/zph.12000>
11. Hassani A., Khan G. Human-animal interaction and the emergence of SARS-CoV-2. *JMIR Public Health and Surveillance*. 2020; 6 (4):e22117. <https://doi.org/10.2196/22117>
12. Berthiusen A., Richardson O. C., Altringham J. D. Bat Conservation: Global evidence for the effects of interventions. Conservation Evidence Series Synopses. Cambridge: University of Cambridge; 2021; 266–269. <https://www.conservationalevidence.com/synopsis/pdf/32>
13. Kelly A., Goodwin S., Grogan A., Mathews F. Post-release survival of hand-reared pipistrelle bats (*Pipistrellus* spp.). *Animal Welfare*. 2008; 17 (4): 375–382. <https://doi.org/10.1017/S0962728600027871>
14. Serangeli M. T., Cistrone L., Ancillotto L., Tomassini A., Russo D. The post-release fate of hand-reared orphaned bats: survival and habitat selection. *Animal Welfare*. 2012; 21 (1): 9–18. <https://doi.org/10.7120/096272812799129510>
15. Apoorva, Singh S. K. A tale of endurance: bats, viruses and immune dynamics. *Future Microbiology*. 2024; 19 (9): 841–856. <https://doi.org/10.2217/fmb-2023-0233>
16. Calisher C. H., Childs J. E., Field H. E., Holmes K. V., Schountz T. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006; 19 (3): 531–545. <https://doi.org/10.1128/CMR.00017-06>
17. Harazim M., Perrot J., Varet H., Bourhy H., Lannoy J., Pékula J., et al. Transcriptomic responses of bat cells to European bat lyssavirus 1 infection under conditions simulating euthermia and hibernation. *BMC Immunology*. 2023; 24 (1):7. <https://doi.org/10.1186/s12865-023-00542-7>
18. Williams E. P., Spruill-Harrell B. M., Taylor M. K., Lee J., Nywening A. V., Yang Z., et al. Common themes in zoonotic spillover and disease emergence: lessons learned from bat- and rodent-borne RNA viruses. *Viruses*. 2021; 13 (8):1509. <https://doi.org/10.3390/v13081509>
19. Aguilar Rangel M., Dolan P. T., Taguwa S., Xiao Y., Andino R., Frydman J. High-resolution mapping reveals the mechanism and contribution of genome insertions and deletions to RNA virus evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2023; 120 (31):e2304667120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2304667120>
20. Becker D. J., Crowley D. E., Washburne A. D., Plowright R. K. Temporal and spatial limitations in global surveillance for bat filoviruses and henipaviruses. *Biology Letters*. 2019; 15 (12):20190423. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2019.0423>
21. Sarabiev V., Shvydka S., Lisitsyna O., Oros M., Miterpáková M., Ždimalová M. The sample size matters: evaluating minimum and reasonable values in prevalence studies. *International Journal for Parasitology*. 2025; 55 (13): 683–693. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2025.05.003>
22. Martínez-Puchol S., Tarradas-Aleman M., Mejías-Molina C., Itarte M., Rusiñol M., Baliellas J., et al. Target enrichment metaviromics enables comprehensive surveillance of coronaviruses in environmental and animal samples. *Heliyon*. 2024; 10 (11):e31556. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e31556>
23. Greninger A. L. A decade of RNA virus metagenomics is (not) enough. *Virus Research*. 2018; 244: 218–229. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.10.014>
24. Ohlopokova O. V., Popov Ig. V., Popov Il. V., Stolbunova K. A., Stepanyuk M. A., Moshkin A. D., et al. Detection and phylogenetic analysis of alphacoronaviruses in bat populations of Rostov and Novosibirsk Regions of Russia, 2021–2023. *Microbiology Research*. 2025; 16 (1):3. <https://doi.org/10.3390/microbiolres16010003>
25. Ohlopokova O. V., Stolbunova K. A., Popov Il. V., Popov Ig. V., Kabwe E., Davidyuk Y. N., et al. Detection of Brno loanvirus (*Loanvirus brunaense*) in common noctule bats (*Nyctalus noctula*) in Southern Russia. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2025; 56 (1): 675–682. <https://doi.org/10.1007/s42770-024-01587-5>
26. Claro I. M., Ramundo M. S., Coletti T. M., da Silva C. A. M., Valença I. N., Candido D. S., et al. Rapid viral metagenomics using SMART-9N amplification and nanopore sequencing. *Wellcome Open Research*. 2023; 6:241. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.17170.2>
27. Oude Munnink B. B., Cotten M., Canuti M., Deijls M., Jebbink M. F., van Hemert F. J., et al. A novel astrovirus-like RNA virus detected in human stool. *Virus Evolution*. 2016; 2 (1):vew005. <https://doi.org/10.1093/ve/vew005>
28. Роев Г. В., Борисова Н. И., Чистякова Н. В., Выходцева А. В., Акимкин В. Г., Хафизов К. Ф. Бастровирусы (*Astroviridae*): генетическое разнообразие и потенциальное влияние на здоровье человека

и животных. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68 (6): 505–512. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-192>

Roev G. V., Borisova N. I., Chistyakova N. V., Vyhodtseva A. V., Akimkin V. G., Khafizov K. F. *Bastroviruses (Astroviridae): genetic diversity and potential impact on human and animal health. Problems of Virology*. 2023; 68 (6): 505–512. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-192>

29. Jones B. D., Kaufman E. J., Peel A. J. Viral co-infection in bats: a systematic review. *Viruses*. 2023; 15 (9):1860. <https://doi.org/10.3390/v15091860>

30. Takemae N., Kuba Y., Oba K., Kageyama T. Direct genome sequencing of respiratory viruses from low viral load clinical specimens using the target capture sequencing technology. *Microbiology Spectrum*. 2024; 12 (11):e0098624. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00986-24>

31. Cerro-Monje A., Buenestado-Serrano S., Palomino-Cabrera R., Molero-Salinas A., Herranz M., Alonso R., et al. A solution to achieve sequencing from SARS-CoV-2 specimens with low viral loads:

concatenation of reads from independent reactions. *Virology Journal*. 2024; 21 (1):121. <https://doi.org/10.1186/s12985-024-02347-5>

32. Marcolungo L., Beltrami C., Degli Esposti C., Lopatriello G., Piubelli C., Mori A., et al. ACoRE: accurate SARS-CoV-2 genome reconstruction for the characterization of intra-host and inter-host viral diversity in clinical samples and for the evaluation of re-infections. *Genomics*. 2021; 113 (4): 1628–1638. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.04.008>

Поступила в редакцию / Received 03.03.2026

Поступила после рецензирования / Revised 19.05.2026

Принята к публикации / Accepted 15.06.2026

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Столбунова Кристина Александровна, младший научный сотрудник лаборатории геномики и эволюции вирусов НИИ вирусологии ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-3376-945x>, kristina.sunwo@yandex.ru

Kristina A. Stolbunova, Junior Researcher, Laboratory of Genomics and Evolution of Viruses, Research Institute of Virology, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-3376-945x>, kristina.sunwo@yandex.ru

Степанюк Марина Алексеевна, младший научный сотрудник лаборатории геномики и эволюции вирусов НИИ вирусологии ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск, Россия; <https://orcid.org/0009-0002-2658-7746>, stepanunya1996@gmail.com

Marina A. Stepanyuk, Junior Researcher, Laboratory of Genomics and Evolution of Viruses, Research Institute of Virology, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia; <https://orcid.org/0009-0002-2658-7746>, stepanunya1996@gmail.com

Мошкин Алексей Дмитриевич, младший научный сотрудник лаборатории геномики и эволюции вирусов НИИ вирусологии ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-1182-8247>, alex.moshkin727@gmail.com

Alexey D. Moshkin, Junior Researcher, Laboratory of Genomics and Evolution of Viruses, Research Institute of Virology, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-1182-8247>, alex.moshkin727@gmail.com

Попов Игорь Витальевич, PhD, научный сотрудник Института живых систем ФГБОУ ВО ДГТУ, г. Ростов-на-Дону, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-9223-8731>, ipopov@donstu.ru

Igor V. Popov, PhD, Researcher, Institute of Living Systems, Don State Technical University, Rostov-on-Don, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-9223-8731>, ipopov@donstu.ru

Охлопкова Олеся Викторовна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории геномики и эволюции вирусов НИИ вирусологии ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-8214-7828>, ohlopkova.lesia@yandex.ru

Olesia V. Ohlopkova, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Genomics and Evolution of Viruses, Research Institute of Virology, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-8214-7828>, ohlopkova.lesia@yandex.ru

Вклад авторов: Столбунова К. А. – разработка концепции, формулировка и развитие ключевых целей и задач, проведение исследований, сбор, анализ и интерпретация полученных данных, подготовка и редактирование текста, участие в научном дизайне, подготовка, создание рисунков и таблиц в части визуализации и отображения данных; Степанюк М. А. – проведение исследований, сбор данных, анализ и интерпретация полученных данных, подготовка и редактирование текста, участие в научном дизайне; Мошкин А. Д. – проведение исследований, сбор, анализ и интерпретация полученных данных, подготовка и редактирование текста, участие в научном дизайне; Попов И. В. – проведение исследований, сбор, анализ и интерпретация полученных данных, предоставление материалов, лабораторных образцов от животных; Охлопкова О. В. – разработка концепции, формулировка и развитие ключевых целей и задач, утверждение окончательного варианта, принятие ответственности за все аспекты работы, целостность всех частей статьи и окончательный вариант.

Contribution of the authors: Stolbunova K. A. – conceptualization; formulation and development of key goals and objectives; investigation; data curation, analysis, and interpretation; writing – original draft preparation and editing; participation in study design; preparation of figures and tables, including data visualization and presentation; Stepanyuk M. A. – investigation; data collection, analysis, and interpretation; writing – original draft preparation and editing; participation in study design; Moshkin A. D. – investigation; data collection, analysis, and interpretation; writing – original draft preparation and editing; participation in study; Popov I. V. – investigation; data collection, analysis, and interpretation; provision of materials and laboratory animal samples; Ohlopkova O. V. – conceptualization; formulation and development of key goals and objectives; final manuscript approval; accountability for all aspects of the work, including the integrity of all parts of the article and the final version.

ЖУРНАЛ «ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ» ПРИГЛАШАЕТ АВТОРОВ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ СВОИХ НАУЧНЫХ РАБОТ

- Журнал основан в 2012 г. на базе ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных».
- Статьи публикуются на двух языках: русском и английском.
- Основными направлениями являются результаты теоретических и экспериментальных исследований в области ветеринарии и ветеринарной микробиологии, тенденций развития ветеринарной науки, обсуждение актуальных вопросов в области мониторинга и эпизоотологии болезней животных.
- Журнал распространяется по всей территории России, а также в крупнейших мировых научных центрах.
- Мы публикуем статьи как выдающихся, так и молодых ученых, специалистов-практиков, работников ветеринарных учреждений для обмена опытом, обеспечения устойчивого ветеринарного благополучия и новых научных дискуссий.

ЗАДАЧИ ЖУРНАЛА

- Изучение основных тенденций развития ветеринарной науки.
- Анализ широкого круга передовых технологий в области мониторинга и эпизоотологии болезней животных, представление результатов теоретических и экспериментальных исследований в данной области.
- Обсуждение актуальных вопросов ветеринарии.

ПОДРОБНЕЕ ОБ УСЛОВИЯХ ПУБЛИКАЦИИ СТАТЕЙ ВЫ МОЖЕТЕ УЗНАТЬ В НАШЕЙ РЕДАКЦИИ

Адрес: 600901, Владимирская обл., г. Владимир, мкр. Юрьево, ул. Гвардейская, д. 6

Телефоны: +7 (4922) 26-15-12, 26-17-65, 26-19-88, доб. 22-27

Контактное лицо: Никешина Татьяна Борисовна,
e-mail: nikeshina@arriah.ru

Узнайте больше на сайте журнала
<https://veterinary.arriah.ru/jour>

**«Ветеринария сегодня» –
это прекрасная возможность
заявить о себе миру!**

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫМ СТАТЬЯМ

К публикации принимаются статьи на двух языках – русском и английском, – содержащие результаты собственных научных исследований, объемом не менее 3000 слов для оригинальных статей и до 6000 слов – для обзора. Шрифт – Times New Roman (кириллица, 12 pt). Междустрочный интервал – одинарный.

Предоставление в редакцию рукописи статьи является подтверждением согласия автора на использование его произведения как в бумажном, так и в электронном виде. Авторы несут ответственность за полноту и достоверность цитируемой в их работах литературы, а также за публикацию заимствованного материала без ссылки на источник. Материалы направляются в редакцию с сопроводительным письмом от организации автора (форма на сайте).

СТРУКТУРА ПРЕДОСТАВЛЯЕМОЙ СТАТЬИ

1. УДК

2. Название статьи

3. **Имя, отчество, фамилия авторов**, место работы, город, страна, ORCID ID, адрес электронной почты.

4. **Резюме** (краткое точное изложение содержания статьи, включающее фактические сведения и выводы описываемой работы): 200–250 слов, но не более 2000 знаков. Для оригинальных статей резюме должно быть обязательно структурировано и включать разделы, отражающие порядок проведения исследования: *введение, цель исследования, материалы и методы, результаты, заключение*. Для обзоров и других типов публикаций структурирование резюме рекомендовано.

5. **Ключевые слова** (5–6 слов, словосочетаний), наиболее точно отображающие специфику статьи.

6. **Благодарности** (в случае финансирования исследования организацией или желания выразить благодарность определенным людям).

7. Для цитирования

8. Конфликт интересов

9. **Для корреспонденции** (фамилия, имя, отчество (полностью), ученая степень, научное звание, должность, адрес, электронная почта).

10. Введение

11. Материалы и методы

12. Результаты и обсуждение

13. Выводы или заключение

14. **Список литературы** (ванкуверский стиль – расположение источников в порядке их цитирования; количество цитируемых работ в оригинальных статьях – около 30, в обзорах – не более 60).

15. **Информация об авторах** (фамилия, имя, отчество (полностью), ученая степень, научное звание, должность, город, страна).

16. **Вклад авторов** (необходимо указать вклад авторов в подготовку статьи).

17. К размещению принимаются иллюстрированные материалы (фото, графики) хорошей контрастности, с разрешением не ниже 300 точек на дюйм (300 dpi), оригиналы прикладываются к статье отдельными файлами в формате .tif или .jpg (рисунки, не соответствующие требованиям, будут исключены из статей, поскольку достойное их воспроизведение типографским способом невозможно).

Работа должна быть представлена в редакторе WORD, формат DOC, шрифт Times New Roman, размер шрифта – 12 pt, межстрочный интервал – одинарный, размер полей – по 2 см, отступ в начале абзаца – 1 см, форматирование по ширине.

Рисунки, таблицы, схемы, графики и пр. должны быть обязательно пронумерованы, иметь источники и умещаться в печатное поле страницы. Название таблицы – над таблицей; название рисунка/графика – под рисунком/графиком. Максимальное суммарное количество таблиц и рисунков в одной статье должно быть не более 5.

Оригиналы и копии присланных статей не возвращаются. Авторы должны гарантировать, что поданный материал не был ранее опубликован. Важным условием для принятия статей в журнал «Ветеринария сегодня» является выполнение всех вышеперечисленных требований редакции.



ФГБУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»
FEDERAL CENTRE FOR ANIMAL HEALTH (ARRIAH)

РЕФЕРЕНТНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ ВОЗЖ ПО ЯЩУРУ
WOAH REFERENCE LABORATORY FOR FOOT AND MOUTH DISEASE

РЕФЕРЕНТНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ ВОЗЖ ПО ГРИППУ ПТИЦ
WOAH REFERENCE LABORATORY FOR AVIAN INFLUENZA

РЕФЕРЕНТНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ ВОЗЖ ПО БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА
WOAH REFERENCE LABORATORY FOR NEWCASTLE DISEASE

ЦЕНТР ВОЗЖ ПО СОТРУДНИЧЕСТВУ В ОБЛАСТИ ДИАГНОСТИКИ
И КОНТРОЛЯ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ СТРАН
ВОСТОЧНОЙ ЕВРОПЫ, ЦЕНТРАЛЬНОЙ АЗИИ И ЗАКАВКАЗЬЯ
WOAH COLLABORATING CENTRE FOR DIAGNOSIS AND CONTROL OF VIRAL
ANIMAL DISEASES IN EASTERN EUROPE, CENTRAL ASIA AND TRANSCAUCASIA

РЕФЕРЕНТНЫЙ ЦЕНТР ФАО ПО ЯЩУРУ
FAO REFERENCE CENTRE FOR FOOT-AND-MOUTH DISEASE

РЕФЕРЕНТНЫЙ ЦЕНТР ФАО ПО ЗООНОЗНЫМ КОРОНАВИРУСАМ
FAO REFERENCE CENTRE FOR ZOO NOTIC CORONAVIRUSES



БАЗОВАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГОСУДАРСТВ – УЧАСТНИКОВ СНГ ПО ПОВЫШЕНИЮ КВАЛИФИКАЦИИ
И ПЕРЕПОДГОТОВКЕ КАДРОВ В ОБЛАСТИ ДИАГНОСТИКИ И КОНТРОЛЯ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ
CIS BASE CHAIR FOR ADVANCED TRAINING AND PROFESSIONAL RETRAINING IN THE FIELD OF ANIMAL DISEASE DIAGNOSIS AND CONTROL

УЧЕБНЫЙ ЦЕНТР ФГБУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных» осуществляет образовательную деятельность в сфере дополнительного профессионального образования на основании лицензии Федеральной службы по надзору в сфере образования и науки.

Курсы повышения квалификации и подготовка ветеринарных специалистов ведутся по теме «Диагностика, мониторинг и профилактика особо опасных болезней животных», при этом большое внимание уделяется учебным мероприятиям по диагностике и профилактике бешенства животных.

В рамках образовательной деятельности реализуются следующие программы:

- «Лабораторная диагностика бешенства животных (метод флуоресцирующих антител, биологическая проба на мышах)», объем – 38 академических часов, очная форма обучения (г. Владимир);

- «Обнаружение антител к вирусу бешенства в конкурентном варианте твердофазного иммуноферментного анализа», объем – 31 академический час, очная форма обучения (г. Владимир);

- «Метод выделения вируса бешенства в культуре клеток», объем – 72 академических часа, очная форма обучения (г. Владимир);

- «Обучение лабораторной диагностике бешенства с помощью тест-системы «ВНИИЗЖ-бешенство-С-ОТ-ПЦР», объем – 22 академических часа, очная форма обучения (г. Владимир).

Освоение курса предусматривает отбор проб патологического материала и обучение правилам их пересылки для лабораторных исследований, пробоподготовку, осуществление диагностических исследований, учет результатов реакций, обмен опытом работы.

Занятия проводят ведущие научные сотрудники ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Все учебные программы соответствуют государственным квалификационным требованиям.

По окончании курса слушателям выдаются удостоверения о повышении квалификации.

Организация учебного процесса, включая обеспечение надлежащих условий обучения, осуществляется в соответствии с действующим законодательством в сфере образования, а также внутренними нормативными актами учреждения.

Подробную информацию можно получить по тел. +7 (4922) 52-99-62 или электронной почте demidova@arriah.ru

