



Вакцина против репродуктивного и респираторного синдрома свиней живая аттенуированная с растворителем

ВЕРРЕС-PPCC-live

Предназначена для иммунизации свиней в неблагополучных по данному заболеванию хозяйствах

Однократная вакцинация

Продолжительность иммунного ответа не менее 6 месяцев



ВЕТЕРИНАРИЯ 1 • 2026



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

ЖУРНАЛ ОСНОВАН В МАЕ 1924 г. МОСКВА

В НОМЕРЕ

- 3 **Макаров В.В., Стекольников А.А.** Очередные уроки панзоотии африканской чумы свиней

ПРАКТИКА: ОПЫТ, ПРОБЛЕМЫ, ПЕРСПЕКТИВЫ

- 11 **Гильдилов Д.И., Кашковская Л.М., Сафарова М.И., Хороводов А.П.** Азитронит ТАБ: фармакокинетические преимущества диспергируемого азитромицина и эффективность при респираторных инфекциях у мелких домашних животных

ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

- 18 **Верховский О.А., Чунихина О.А., Корнеева Ю.В., Корицкая М.А., Алипер Т.И.** спектр и антигенная активность белков изолята МА-21 вируса вирусной диареи крупного рогатого скота второго типа

ИНВАЗИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

- 25 **Василевич Ф.И., Дёмкина О.В., Никанорова А.М.** Эффективность фенбендазола и *Bacillus subtilis* у лошадей при стронгилидозах

АКУШЕРСТВО, ГИНЕКОЛОГИЯ

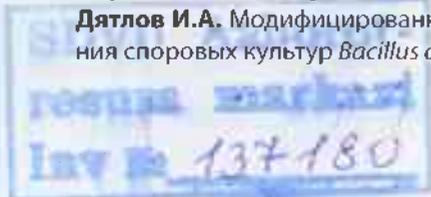
- 31 **Солодова Е.В., Сакаев В.А., Лебедева Л.Ф.** Разные методы подготовки свежеразбавленной и заморожено-оттаянной спермы жеребцов для использования в ИКСИ или ЭКО технологиях

ФАРМАКОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ

- 37 **Мандрыка Е.Д., Шастин П.Н., Лаишевцев А.И., Степанова Т.В.** Пробиотический потенциал лактобацилл

ЛАБОРАТОРНАЯ ПРАКТИКА

- 41 **Сафина Г.М., Косарев М.А., Насибуллин Р.Ю.** Хемостатное культивирование R-штамма бруцелл
- 46 **Лазарева О.И., Сивкова Т.Н., Иванов В.А.** Цитотоксическое и цитопатическое действие экстракта из *Anisakis simplex* L3 на культуры эукариотических клеток
- 52 **Маринин Л.И., Миронова Р.И., Шишкова Н.А., Тюрин Е.А., Мокриевич А.Н., Дятлов И.А.** Модифицированный LB-агар для приготовления и длительного хранения споровых культур *Bacillus anthracis*



IN THE ISSUE

- 3 **Makarov V.V., Stekolnikov A.A.** Another lessons of pan-zootic African swine fever

EXPERIMENT, PROBLEMS, PERSPECTIVES

- 11 **Gildikov D.I., Kashkovskaya L.M., Safarova M.I., Khorovodov A.P.** Azitronit Tab: pharmacokinetic benefits of dispersible azithromycin and efficacy in respiratory infections in small pets

INFECTIOUS DISEASES

- 18 **Verkhovsky O.A., Chunikhina O.A., Korneeva Yu.V., Koritskaya M.A., Aliper T.I.** Viral proteins and its antigenic activity of bovine viral diarrhoea virus isolate of the second type

INVASIVE DISEASES

- 25 **Vasilevich F.I., Demkina O.V., Nikanorova A.M.** The effectiveness of combined use of fenbendazole and *Bacillus subtilis* in horses with benzimidazole-resistant strongylids

OBSTETRICS, GYNECOLOG

- 31 **Solodova E.V., Sakaev V.A., Lebedeva L.F.** Preparation of freshly diluted and frozen-thawed stallion sperm by various methods for use in ICSI or IVF technologies

PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY

- 37 **Mandryka E.D., Shastin P.N., Laishevtsev A.I., Stepanova T.V.** Probiotic potential of lactobacilli

LABORATORY PRACTICE

- 41 **Safina G.M., Kosarev M.A., Nasibullin R.Yu.** Chemostatic cultivation of the R-strain of brucella
- 46 **Lazareva O.I., Sivkova T.N., Ivanov V.A.** Cytopatic effect of somatic extract of *Anisakis simplex* L3 on the culture of eukaryotic cells
- 52 **Marinin L.I., Mironova R.I., Shishkova N.A., Tyurin E.A., Mokrievich A.N., Dyatlov I.A.** The LB-agar modified for prepared and long-term preservation cultures of *Bacillus anthracis*

Главный редактор
Т.В. СТОЛЛЯР

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

Редакторы
Т.В. Столляр,
А.Т. Столляр

Художественное и техническое
редактирование
А.В. Кремнев

Подписано к печати 25.12.2025.
Формат 70x100 1/16.
Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 5,2.
Заказ 25-0600.

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

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

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

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

Отпечатано в типографии
ООО «Типография»
Кантемировский ул., д. 60
typografa.moscow

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

For suggestions, please contact: "Veterinariya" Journal,
Riazansky prospectus, 24, 1, Moscow, 109428, Russia.
e-mail: anovet24@yandex.ru

ОЧЕРЕДНЫЕ УРОКИ ПАНЗООТИИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Владимир Владимирович Макаров, д.б.н., профессор, vvm-39@mail.ru

ФГБУ «Центр ветеринарии» (129344, г. Москва, ул. Лётчика Бабушкина, д. 20)

Анатолий Александрович Стекольников, д.в.н., профессор, академик РАН, stekolnikov-anatolii@mail.ru

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»
(196084, г. Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д. 5)

В статье представлены материалы, связанные с возможностью применения предлагаемых живых аттенуированных вакцин против африканской чумы свиней. Рассмотрены новые нетривиальные элементы эволюции вируса в эпизоотическом процессе. **Ключевые слова:** африканская чума свиней, живые аттенуированные вакцины, эволюция вируса.

Another lessons of panzootic African swine fever

V.V. Makarov, PhD in Biology, Professor, vvm-39@mail.ru

Center for Veterinary (129344, Moscow, Letchika Babushkina St., 20)

A.A. Stekolnikov, PhD in Veterinary Science, Professor, Academician the RAS, stekolnikov-anatolii@mail.ru

Saint Petersburg State University of Veterinary Medicine (196084, Saint Petersburg, Chernigovskaya St., 5)

The paper discusses the issues related to the possibility of using the proposed live attenuated vaccines against African swine fever. New non-trivial elements of virus evolution in the epizootic process are considered. **Key words:** African swine fever, live attenuated vaccines, virus evolution.

DOI: 10.30896/0042-4846.2026.29.01.03-08

Текущая панзоотия африканской чумы свиней и обусловленная этим известная патовая ситуация, несомненно, требуют адекватной интерпретации и экстраординарных решений. Согласно анализу базы данных PubMed® – крупнейшей текстовой базы медицинских и биологических публикаций, глобальная публикационная активность по проблеме активизирована в последние годы и естественно отражает как чрезвычайный научный интерес, так и масштабы исследований. Настоящее сообщение посвящено анализу двух развивающихся направлений – результатов изучения иммуногенных и протективных качеств разрабатываемых вариантов вакцинных препаратов и связанных с этим неожиданных процессов и явлений в эпизоотологии и эволюции вируса.

Проблема вакцинации. Общий вывод на основании полученных результатов в том, что сколько-нибудь перспективными в отношении защиты от заражения могли бы быть только живые вакцины из вариантов вируса (i) природно ослабленных, (ii) искусственно

аттенуированных путем селекции в лаборатории или (iii) генетически модифицированных мутантов. Но живые вакцины при масштабном применении на популяционном уровне всегда несут в себе существенный риск реактогенности и даже реверсии вирулентности, т.е. высокой степени неконтролируемой репродукции *in vivo* и непредсказуемого эпизоотического распространения вакцинного вируса с развитием «рукотворных» эпизоотий. Именно поэтому широкая иммунизация свиней живой вакциной I генотипа вируса против АЧС в начале 1960-х гг. в Испании привела к массовому проявлению вялотекущей формы поствакцинального течения инфекции, распространению и укоренению заболеваемости по всему Иберийскому полуострову с энзоотией продолжительностью в 35 лет.

Конструирование в США аттенуированного варианта эпизоотического вируса АЧС «Грузия-2007» II генотипа с искусственно deletированными генами, предположительно ответственными за вирулентность, получившего условное

название ASFV-G-ΔMGF, вселило надежду на возможность создания столь необходимой и ожидаемой эффективной и безопасной живой вакцины в общепринятом понимании. В первичных лабораторных испытаниях на свиньях подобные иммунизирующие препараты показали вполне удовлетворительные защитные качества [9]. Далее в США, Китае, Вьетнаме была создана серия живых аттенуированных вакцин (ЖАВ). На основе модифицированных вариантов вируса уже выпускают в коммерческом плане и широко используют подобные ЖАВ, нелицензированные нигде, кроме Вьетнама (см. таблицу). ЖАВ проходят процедуру регистрации во многих странах Юго-Восточной Азии (Индия, Индонезия, Малайзия, Непал, Мьянма) [5, 7].

Как и следовало ожидать, не отработанное должным образом применение таких ЖАВ на практике уже привело к случаям выявления на фермах новой, умеренно летальной формы заболевания с хроническим течением и иными побочными эффектами, что может стать причиной повторения «испанской» истории. В связи с этим власти Китая вынуждены были провести специальное заседание, выпустить ряд директивных документов и принять жесткие меры по пресечению несанкционированного распространения и использования подобных препаратов вплоть до уголовного преследования [12].

Использование ЖАВ по всему Вьетнаму, наиболее рьяно взявшемуся за

Вакцины против АЧС и масштаб применения (июнь, 2024) [5, 7]

Страна	Вакцины, количество доз	
	NAVETCO	AVAC
Вьетнам	660000	3296710
Доминикана	7000	–
Филиппины	–	300000
Нигерия	–	5000
Всего	667000	3601710

тотальное внедрение специфической профилактики АЧС, никоим образом не влияет на ситуацию. По текущим официальным сообщениям, эпизоотический риск стабильно растет и негативно сказывается на свиноводческой отрасли, поставках продовольствия и окружающей среде. Вместе с тем это уже повлияло на генетический пул возбудителя, циркулирующего в местной популяции свиней. Как установлено, один из вакцинных вариантов спонтанно распространился в наивных стадах с высоким уровнем замены дикого вируса. У инфицированных животных новый вирус вызывал незначительные или легкие симптомы, тогда как у беременных свиноматок наблюдали более серьезные репродуктивные нарушения, сопровождающиеся массивным некротизирующим васкулитом с фибриноидной дегенерацией репродуктивных органов и вымени, тяжелым послеродовым язвенным дерматитом вымени у лактирующих свиноматок с установлением вирусной природы поражений, вызванных иммунными комплексами. Как и ожидалось, генетический анализ подтвердил соответствие «нового полевого изолята» штамму пропагандируемой и воспринятой во Вьетнаме американской вакцины [13].

После таких «результатов» на практике вакцинные штаммы и вакцинация были уже *post factum* подвергнуты экспериментальным исследованиям на безопасность и генетическую стабильность. В опытах установлено, что инокуляция вакцинного штамма беременным свиноматкам сопровождается умеренными клиническими признаками, характерными для АЧС. Мертвыми рождались 43 % потомства, у живорожденных поросят также развивались специфические клинические признаки АЧС, вирусемия, и только 17 % выживали до кон-

ца исследования. Через 3 – 4 пассажа на свиньях вьетнамский вакцинный штамм ASFV-G-Δ1177L восстановил вирулентность с тяжелыми клиническими признаками, повышенной и продолжительной вирусемией. Выявлены мутации, ответственные за реверсию повышенной репликативной приспособленности и вирулентности. Все это свидетельствовало, что штамм не является генетически стабильным и не безопасен для использования в вакцинах против АЧС [6]. В другом тестировании на реверсию вирулентности пассированием *in vivo* выявлен новый вариант вируса, не летальный, но вызывающий транзиторную лихорадку, с повышенной репликацией и экскрецией [8].

Необходимо отметить, что изложенные особенности «аттенуации» и «вакцин» против АЧС хорошо известны по результатам отечественных исследований, выполненных ВНИИВВиМ в 1966 – 1986 гг. Здесь с помощью селекции в культуре макрофагов свиньи по фенотипу, коррелирующему с вирулентностью (интенсивность гемадсорбции), были получены авирулентные дериваты вируса имеющихся на тот момент эпизоотических серо/иммунотипов африканского и европейского происхождения, индуцирующие адаптивный иммунный ответ и удовлетворительную защиту от гомологичного контрольного заражения [14]. Их протективные характеристики в принципе были аналогичны предварительным, экспериментально установленным для штаммов, послужившим основанием для создания «американо-вьетнамских» ЖАВ, очевидно преждевременного. Однако, благодаря тестированию по исчерпывающему спектру критериев, имеющих отношение к иммуногенности, возможной реактогенности, реверсии и в целом эпизоотической безопасности, были выявлены

по сути те же отложенные патологические последствия применения – хронизация, персистирующая инфекция с экстенсивным клиническим проявлением умеренного характера, при отсутствии такового пневмонии, миокардиты на вскрытии. Уже тогда сложилось убеждение, что искусственно приобретенный протективный иммунитет против АЧС не укладывается в банальные представления о противoinфекционной защите за счет примитивных антительных реакций нейтрализации. В этом плане тогда же было установлено, что защита «напрямую» от контрольного заражения не обусловлена тем набором эффекторов иммунной системы, которые обеспечивают общепринятую напряженность и продолжительность адаптивного иммунитета [1].

В отношении «вьетнамской инициативы» специфической профилактики АЧС, распространяющейся во всем юго-восточно-азиатском регионе [11], кроме Китая, несомненно, что применение там «вакцин» имеет смысл только в странах, где национальные ветеринарные службы *a priori* не способны обеспечить стандарты искоренения АЧС и соглашаются с такими последствиями, добываясь лишь сокращения экономического ущерба путем ограничения смертности и клинической заболеваемости. Такой подход, вероятно, приемлем при общественно-хозяйственном укладе с «закрытым» свиноводством лишь для внутреннего потребления, но с гарантированным соблюдением ветеринарно-санитарных требований, категорически исключающих любую возможность попадания за их пределы любой продукции свиного происхождения. Тем не менее при неконтролируемом, контрафактном применении недоработанные «вакцины» с вполне реальным эпизоотическим распространением новых штаммов вируса

сохраняют глобальную угрозу с непредсказуемыми последствиями.

Кстати, этот принцип ограниченной строго контролируемой «вакцинации» также давно сформулирован в отечественной науке по ходу упомянутых выше разработок ВНИИВВиМ. При возникновении эпизоотических вспышек АЧС, в случае экстренной экономической необходимости, применение иммунизирующих препаратов аттенуированных вариантов вируса предполагалось для сохранения экспозированного свинополовья (животных, подозреваемых в заражении), по современным требованиям подлежащего ликвидации радикальным методом (стемпинг аут), на период его промышленной переработки, исходя из хозяйственной целесообразности (прежде всего изготовления мясных консервов, как было некогда в условиях специализированных санитарных боен, отдельных цехов мясокомбинатов или рабочих смен для убоя скота при ящуре, свиней – классической чуме и др.).

Все, что делается относительно специфической профилактики АЧС, активно поощряется международными организациями. В текущем году 92-й Генеральной сессией ВОЗЖ/МЭБ был принят стандарт, направленный на предоставление производителям и потребителям минимальных требований к безопасности и эффективности вакцин против АЧС [4]. Документ по форме не вполне обычный, не содержит надлежащих в таких случаях, как правило, конкретных для биопрепаратов параметров. Однако в нем учтены все издержки небольшого, но отрицательного опыта в этом направлении. Утверждается достаточность того, чтобы вакцины были эффективными лишь в снижении тяжести заболевания, ограничении передачи вируса, стимуляции защиты у животных

и тем самым обеспечивали сокращение производственных потерь от инфекции. Эти качества должны быть, безусловно, доказаны перед использованием – что они не вызывают длительных или тяжелых клинических признаков, не наносят вреда окружающей среде, не содержат посторонние вирулентные вирусы или другие вредные агенты, соответствуют циркулирующему эпизоотическому генотипу АЧС в зоне вакцинации. Эффективность вакцинации должна обеспечивать также такое новое и нетривиальное, специфическое для АЧС требование, как недопущение риска спонтанной рекомбинации вакцинных вирусов с циркулирующими вирусами в условиях естественной инфекции и формирования новых эпизоотических штаммов, более сложных для идентификации и контроля, беспрепятственно распространяющихся на «вакцинированном» фоне.

Эволюция вируса. Как известно, за пределы исходного африканского нозоареала вышел вирус АЧС только I и II генотипа. I генотип был занесен в Португалию в 1957 и 1960 гг., он стал причиной первой панзоотии, ликвидированной, за исключением о. Сардинии, к 1995 г. II генотип занесен в Грузию в 2007 г., вскоре перешел и укоренился в РФ (до сих пор), далее в ЕС в 2014 г., затем в Китае в 2018 г. Он быстро распространился практически по всем государствам Юго-Восточной Азии и прилежащим странам Океании. Таким образом, панзоотия охватила пять континентов, глобальный характер обстановки может быть квалифицирован как стабильно неблагоприятный без признаков улучшения.

Филодинамика вируса в ходе второй панзоотии приняла ожидаемый оборот, в Китае с 2020 г. стали обнаруживать эпизоотические изоляты II генотипа со сниженной вирулентностью для сви-

ней. Далее, в Китае (2021 г.), Вьетнаме (2023), Приморском крае РФ (2024) в условиях естественной инфекции были зарегистрированы новые эпизоотические варианты возбудителя – вирус I генотипа (причина первой панзоотии) и вирулентные химерные вирусы-рекомбинанты I+II генотипа. Поскольку естественной циркуляции первого уже нет в ранее панзоотичном пространстве, наиболее вероятной причиной возврата и столь эффективного вмешательства в реальный эпизоотический процесс, казалось бы, давно сошедшего с «эпизоотической сцены» инфекционного агента стал банальный «человеческий фактор». Возможно, это были несанкционированные, контрафактные попытки применения в Китае для профилактики в качестве «вакцины» авирулентного негемадсорбирующего вируса NH/P68 португальского происхождения 1960-х гг., относящегося к I генотипу, с которым новый эпизоотический вариант близок генетически и фенотипически (низкая вирулентность, отсутствие гемадсорбции) [15]. Генетический анализ этих изолятов-геномных химер позволил установить естественный механизм рекомбинации и их спонтанного образования в эпизоотическом процессе даже с определением долевого участия компонентов-доноров в объединенном генотипе. Совместное с генетическим анализом тестирование *in vivo* показало, что вирулентность обуславливают геномные компоненты химер I генотипа. За их же счет осуществляется эвазия от адаптивного иммунного ответа на антигены «вакцинного» компонента II генотипа [10, 15].

Косвенные доказательства вероятной, но уже серо/иммунотиповой популяционной химеризации эпизоотических изолятов вируса АЧС европейского и африканского происхождения

ранее были установлены сотрудниками ВНИИВВиМ в исследованиях *in vivo* [2].

Чрезвычайно важен сам по себе факт естественной генотипической химеризации возбудителя по признакам, имеющим критическое значение в эпизоотологии инфекции. Спонтанное возникновение «вируса-франкенштейна» представляет совершенно новое, не известное ранее парадоксальное явление в инфекционной патологии и экологии – не логичное объединение двух самостоятельных генотипов, «решающих одну и ту же экологическую задачу» как мишень естественного отбора в эпизоотическом процессе. Не зарегистрировано ни одного случая подобного смешивания на субгеномном уровне у вирусов, например, ящура, гриппа, блютанга с классическим антигенным, следовательно, и генетическим плюрализмом. Все их серо-, иммуно-, топо-, гено- и прочие типы в соответствии с экологическим правилом конкурентного исключения [3] циркулируют самостоятельно, хронологически и территориально обособлены. Они занимают новые экологические ниши, в данном случае эпизоотические очаги и нозоареалы, только после их освобождения от других вариантов, главным образом, за счет популяционного иммунитета, естественного или искусственного.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о возможности сверхбыстрой эволюции как вируса с приобретением новых эпизоотически значимых свойств (повышении вирулентности и эвазии иммунитета), так и АЧС *per se*, с «перспективной» возникновения новых непредсказуемых сложностей в контроле заболевания и поиске вакцин. Геномная химеризация по важнейшим эпизоотическим признакам в определенной степени противоречит фундаментальным экологическим принципам.

Экстремальная важность феномена не случайно нашла отражение в упомянутом стандарте ВОЗЖ/МЭБ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Макаров В.В. Иммунологическая концепция африканской чумы свиней (некоторые итоги исследований). Ветеринарная практика. 2013; 62(3):5 – 22.

2. Середина А.Д., Балышев В.М., Моргунов Ю.П. и др. Антигенные свойства вируса африканской чумы свиней в искусственных и естественных смешанных популяциях. Сельскохозяйственная биология. 2014; 4:64 – 69. DOI:10.15389/agrobiology.2014.4.64rus

3. Реймерс Н.Ф. Экология (теории, законы, правила, принципы и гипотезы). М.: Журнал «Россия молодая». 1994; 367 с.

4. African swine fever: WOAH vaccine standard adopted// <https://www.woah.org/en/article/african-swine-fever-woah-vaccine-standard-adopted/>

5. Auer A., Cattoli G., Padungtod P. et al. Challenges in the Application of African Swine Fever Vaccines in Asia. Animals. 2024; 14(17):2473. <https://doi.org/10.3390/ani14172473>

6. Born E., Olasz F., Meszaros I. et al. African swine fever virus vaccine strain Asfv-G-Δ11771 reverts to virulence and negatively affects reproductive performance. NPJ Vaccines. 2025; 10: 46. <https://doi.org/10.1038/s41541-025-01099-9>

7. Chuong V.D., Schambow R.A., Diep N.T. et al. Epidemiology and Control of African Swine Fever in Vietnam: A Scoping Review. Pathogens. 2025; 14(4):329. <https://doi.org/10.3390/pathogens14040329>

8. Deuschmann, P., Forth J., Sehl-Ewert J. et al. Assessment of African swine fever vaccine candidate ASFV-

G-ΔMGF in a reversion to virulence study. NPJ Vaccines. 2-23; 8:78. <https://doi.org/10.1038/s41541-023-00669-z>

9. O'Donnell V., Holinka L., Gladue D. et al. African Swine Fever Virus Georgia Isolate Harboring Deletions of MGF360 and MGF505 Genes Is Attenuated in Swine and Confers Protection against Challenge with Virulent Parental Virus. J. Virol. 2015; Jun;89(11):6048 – 6056. DOI:10.1128/JVI.00554-15

10. Kitamura T., Masujin K., Ikezawa M. et al. Generation of Chimeric African Swine Fever Viruses Through In Vitro and In Vivo Intergenotypic Gene Complementation. Vaccines. 2025; 13:462. <https://doi.org/10.3390/vaccines13050462>

11. Made-in-Vietnam African swine fever vaccines to be exported to Philippines, Indonesia. <https://en.vietnamplus.vn/made-in-vietnam-african-swine-fever-vaccines-to-be-exported-to-philippines-indonesia-post265491.vnp>

12. New China swine fever strains point to unlicensed vaccines. Reuter. Jan. 22, 2021. <https://www.reuters.com/article/us-china-swinefever-vaccines-insight-idUSKBN29R00X>

13. Nguyen T.C., Bui N.T.T., Nguyen L.T. et al. An African swine fever vaccine-like variant with multiple gene deletions caused reproductive failure in a Vietnamese breeding herd. Sci. Rep. 2025; 15:14919. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-95641-3>

14. Seredina A., Balyshev V., Kazakova A. et al. Protective Properties of Attenuated Strains of African Swine Fever Virus Belonging to Seroinmunotypes I – VIII. Pathogens. 2020; 9:274. DOI:10.3390/pathogens9040274

15. Zhao D., Sun E., Huang L. et al. Highly lethal genotype I and II recombinant African swine fever viruses detected in pigs. Nat. Commun. 2023; 14:3096. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38868-w>

УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!

Напоминаем вам, что подписка на 1-е полугодие 2026 г. в местных отделениях связи продолжается

Индекс журнала «Ветеринария» по каталогу ООО «УП УРАЛ-ПРЕСС» – 70130; подписка онлайн и по каталогу в АО «Почта России» – индекс ПИЗ96.

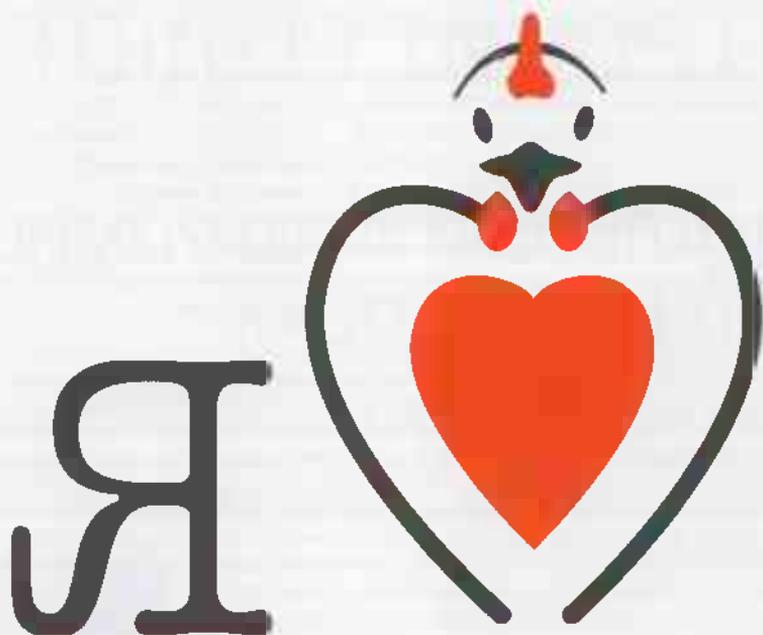
На сайте Научной электронной библиотеки – eLIBRARY.RU вы можете подписаться и приобрести электронную версию журнала или отдельной статьи.

Базовая цена на журнал «Ветеринария» без стоимости доставки и дополнительных услуг почты: на 1 мес – 560 руб., на 3 мес – 1680 руб., на 6 мес – 3360 руб.

Редакционная коллегия и редакция

Ceva

IBird®



**ЗДОРОВЫХ
ЦЫПЛЯТ**

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

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



ПЕРЕД ПРИМЕНЕНИЕМ ОЗНАКОМЬТЕСЬ С ИНСТРУКЦИЕЙ



NITA-FARM
ВЕТЕРИНАРНАЯ ФАРМАЦЕВТИКА

ПЕРЕДОВЫЕ ИННОВАЦИИ МИРОВОЙ ФАРМАЦЕВТИКИ
ДЛЯ БЛАГОПОЛУЧИЯ ПИТОМЦЕВ

АЗИТРОНИТ СОЛЮТАБ

АЗИТРОМИЦИН

СПЕЦИАЛЬНЫЙ АЗИТРОМИЦИН ДЛЯ КОШЕК И СОБАК

ВЕТЕРИНАРНЫЙ АЗИТРОМИЦИН В СПЕЦИАЛЬНЫХ ТАБЛЕТКАХ ОТ РОССИЙСКОГО ПРОИЗВОДИТЕЛЯ ДЛЯ БЫСТРОЙ И НАДЕЖНОЙ ТЕРАПИИ РЕСПИРАТОРНЫХ И ДРУГИХ ИНФЕКЦИЙ У КОШЕК И СОБАК – БЕЗОПАСНАЯ АЛЬТЕРНАТИВА БЕТА-ЛАКТАМНЫМ АНТИБИОТИКАМ

НОВИНКА



PETS.NITA-FARM.RU



Отпускается по рецепту
Имеются противопоказания. Необходимо ознакомиться с инструкцией.



АЗИТРОНИТ ТАБ: ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕИМУЩЕСТВА ДИСПЕРГИРУЕМОГО АЗИТРОМИЦИНА И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЯХ У МЕЛКИХ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ

Дмитрий Иванович Гильдиков, д.в.н., заведующий кафедрой
ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной
медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» (г. Москва, Россия)

Людмила Михайловна Кашковская, к.в.н., руководитель группы
Марина Игоревна Сафарова, к.х.н., руководитель СНИОКР
ООО «НИТА-ФАРМ» (г. Саратов, Россия)

Александр Петрович Хороводов, аспирант
ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии
и инженерии имени Н.И. Вавилова» (г. Саратов, Россия)

Оценена клиническая эффективность лекарственного препарата в форме таблеток на основе азитромицина (Азитронит Таб) при терапии собак и кошек с респираторными инфекциями. Животным со спонтанными ринитами, трахеитами и бронхитами назначали препарат перорально в дозе 10 мг/кг один раз в сутки в течение пяти дней. Эффективность оценивали на 5-е сутки лечения по клиническому состоянию, гематологическим показателям и результатам бактериологических исследований. К этому сроку нормализовалась температура тела, частота сердечных сокращений и дыхательных движений, исчезли клинические симптомы ($p \leq 0,05$). Гематологически зафиксировали снижение лейкоцитоза и лейкоцитарного индекса интоксикации, что указало на купирование воспаления и интоксикации. Бактериологическое исследование выявило 100%-ную эрадикацию патогенной микрофлоры (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* и др.). Побочных реакций на препарат не выявлено. Следовательно, азитромицин в форме таблеток с возможностью диспергирования (Азитронит Таб) – высокоэффективное и безопасное средство для лечения собак и кошек при респираторных инфекциях бактериальной этиологии. Короткий курс терапии обеспечивал полное клиническое выздоровление и эрадикацию возбудителя. **Ключевые слова:** азитромицин, Азитронит Таб, респираторные инфекции, собаки, кошки, макролиды, *Mycoplasma spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*

Azitroneit Tab: pharmacokinetic benefits of dispersible azithromycin and efficacy in respiratory infections in small pets

D.I. Gildikov, PhD in Veterinary Sciences, Head of Department
Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology –
MBA named after K.I. Scriabin (Moscow, Russia)

L.M. Kashkovskaya, PhD in Veterinary Sciences, Group leader

M.I. Safarova, PhD in Chemical Sciences, Leader SNIOKR
NITA-FARM LLC (Saratov, Russia)

A.P. Khorovodov, Graduate student

Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N.I. Vavilov (Saratov, Russia)

The clinical efficacy of a drug in the form of tablets based on azithromycin (Azitroneit Tab) in the treatment of respiratory infections in dogs and cats has been evaluated. Animals with spontaneous rhinitis, tracheitis and bronchitis were given the drug orally at a dose of 10 mg/kg once a day for 5 days. The effectiveness was evaluated on the 5th day of therapy according to the clinical condition, hematological parameters and the results of repeated bacteriological examination. By the 5th day of treatment, a statistically significant ($p < 0,05$) positive trend was established: body temperature, heart rate and respiratory movements returned to normal, and clinical symptoms disappeared. Hematologically, a decrease in leukocytosis and leukocyte intoxication index was recorded, which indicated relief of inflammation and intoxication. Bacteriological examination revealed 100% eradication of pathogenic microflora (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, etc.). No adverse reactions to the drug were detected. Therefore, azithromycin in the form of dispersible tablets (Azitroneit Tab) is a highly effective (100 %) and safe treatment for respiratory infections of bacterial etiology in dogs and cats. A short course of therapy ensured complete clinical recovery and eradication of the pathogen. **Key words:** azithromycin, Azitroneit Tab, respiratory infections, dogs, cats, macrolides, *Mycoplasma spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*
DOI:10.30896/0042-4846.2026.29.01.11-16

Современная практика лечения мелких домашних животных (МДЖ) с респираторными инфекциями сталкивается с растущей проблемой антимикробной резистентности, в частности, к широко применяемым β -лактамным антибиотикам [11, 12]. Необходимо проводить ротацию классов антибактериальных препаратов и искать эффективные альтернативы. К сожалению, существует выраженный дефицит удобных и безопасных в применении ветеринарных форм макролидов, адаптированных для собак и кошек.

Азитромицин – полусинтетический азалид, представляет собой перспективное решение проблемы бактериальных инфекций благодаря уникальному фармакокинетическому профилю [2]. В отличие от многих других антибиотиков он создает исключительно высокие концентрации в легочной ткани, бронхиальном секрете и альвеолярных макрофагах, значительно превышающие сывороточные уровни [2]. Ключевым преимуществом является его способность к активному внутриклеточному накоплению в фагоцитах с последующим транспортом непосредственно в очаг инфекции, где при лизисе клеток происходит высвобождение антибиотика [8, 9]. Это обеспечивает пролонгированное постантибиотическое действие, длящееся до 5 – 10 дней после отмены препарата, что позволяет сократить курс лечения до 3 – 5 дней против стандартных 10 – 14 у других лекарственных средств [7, 9, 10]. Спектр антимикробной активности азитромицина охватывает ключевые респираторные патогены, включая *Mycoplasma spp.*, *Bordetella bronchiseptica*, *Chlamydia felis*, ряд грамположительных кокков (*Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*) и некоторых грамотрицательных бактерий [3, 5].

Безопасность азитромицина хорошо изучена в медицине и подтверждена ветеринарными исследованиями [10]. Он хорошо переносится при соблюдении рекомендованных доз. Практические протоколы лечения собак и кошек с респираторными заболеваниями рекомендуют применять азитромицин в дозе 5 – 10 мг/кг массы тела один раз в сутки перорально в течение пяти дней [6, 7, 10]. Удобная лекарственная форма препарата позволяет соблюсти курсовой режим, что положительно влияет на успех терапии.

Компания «НИТА-ФАРМ» разработала лекарственный препарат на основе азитромицина в форме таблеток для перорального введения домашним животным – Азитронит Таб. Диспергируемая таблетированная форма обеспечивает точность дозирования, значительно упрощает применение (перорально или в растворенном виде) и улучшает биодоступность (диспергируемая форма).

Цель исследования – оценить клиническую эффективность лекарственного препарата Азитронит Таб при терапии собак и кошек с респираторными инфекциями.

Материалы и методы. Эксперимент провели в период с августа по декабрь 2023 г. на базе кафедры общей патологии имени В.М. Коропова в ФГБОУ – МВА имени К. И. Скрябина (Москва) и в ветеринарных клиниках Москвы. Объектами изучения служили собаки (n=8) и кошки (n=8) обоего пола в возрасте от 4 месяцев до 22 лет со спонтанно возникшими патологиями респираторной системы (ринит, трахеит, бронхит или их сочетание). Диагноз ставили комплексно на основании анамнеза, клинического осмотра (наличие экссудата из носа, кашля, одышки, хрипов при аускультации), результатов рино-, трахео- и бронхоскопии, рент-

генологического и гематологического исследований.

Для идентификации возбудителя отбирали смывы/мазки со слизистых оболочек дыхательных путей стерильными зондами в транспортную среду Эймса с последующим бактериологическим исследованием, посевом на питательные среды и подсчетом колониеобразующих единиц (КОЕ). Гематологический анализ крови выполняли на автоматических анализаторах. Определяли концентрацию гемоглобина, гематокрит, число эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, лейкоцитарную формулу. Дополнительно рассчитывали лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ).

После включения в опыт животные получали препарат Азитронит Таб в дозе 10 мг/кг по действующему веществу (азитромицину) перорально один раз в сутки в течение пяти дней. Клинические показатели (температуру тела, частоту сердечных сокращений – ЧСС, частоту дыхательных движений – ЧДД) контролировали ежедневно. Эффективность лечения оценивали на 5-е сутки по результатам повторного клинического осмотра, анализа крови и бактериологических исследований.

Полученные цифровые данные статистически обработали, достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента, отличия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты исследований и обсуждение. Клинический осмотр животных до лечения выявил угнетение, снижение аппетита, истечения из носовых ходов (от катаральных до гнойных), кашель, повышенную чувствительность гортани и трахеи при пальпации. При эндоскопии визуализировали отек и гиперемию слизистых оболочек, наличие катараль-

ного или смешанного экссудата в просвете трахеи и бронхов (рис. 1 – 3).

В таблице 1 представлена динамика ключевых клинических показателей собак и кошек до и после лечения.

Бактериологические исследования до лечения выявили у животных полимикробные ассоциации, включавшие *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, и другие респираторные патогены.

Анализ крови, сделанный до начала терапии, указывал на наличие острого бактериального воспаления и интоксикацию (табл. 2 и 3). У всех животных регистрировали нейтрофильный лейкоци-



Рис. 1. Риноскопия: увеличение слизистой оболочки носового хода и наличие гнойного экссудата у собаки до лечения



Рис. 2. Ларингоскопия: набухание слизистой оболочки глотки у собаки до лечения

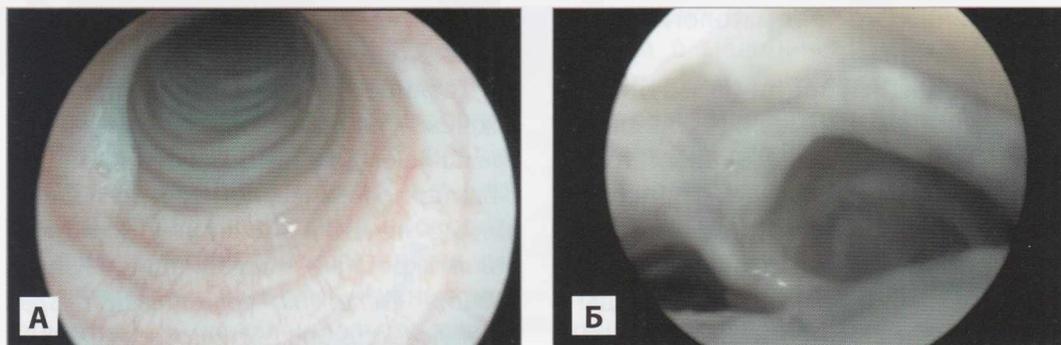


Рис. 3. Трахеобронхоскопия: в области бифуркации бронхов и их полостей (А, Б) у собак до лечения

тоз со сдвигом ядра влево (увеличенное содержание палочкоядерных нейтрофилов), относительную лимфопению и моноцитоз. Отметим также высокий уровень гематокрита и гемоглобина, что указывало на нарушение тканевого газообмена и гипоксию. Лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ) был значительно повышен – до 5,14 усл. ед. у собак и 7,15 усл. ед. у кошек.

После 5-дневного курса терапии препаратом Азитронит Таб отмечена выраженная положительная динамика. У собак достоверно снизилась концентрация гемоглобина на 22 %, что указывает на восстановление тканевого газообмена и усиление клеточного метаболизма за счет нормализации окислитель-

но-восстановительных процессов, и на 8,22 % уменьшилось количество лейкоцитов, свидетельствуя о купировании гипоксии и воспаления. ЛИИ снизился до 3,12 усл. ед., что подтверждает реконвалесценцию организма на фоне терапии. У кошек статистически значимо снизился гематокрит (на 8,1 %) и гемоглобин (на 5,1 %), достоверно возросло число лимфоцитов (в 2,7 раза) и эозинофилов (в 5,6 раза). Посттерапевтическая эозинофилия свидетельствует о достаточно значимом поражении бактериями, после их гибели происходит высвобождение антигенов, на которые организм реагирует повышением данного показателя в крови. ЛИИ уменьшился до 2,5 усл. ед.

Таблица 1

Динамика средних значений клинических показателей животных

Вид животного	Клинические показатели		Нормативное значение
	Первые сутки опыта	Пятые сутки опыта	
Температура тела, °С			
Собаки	39,2±1	38,7±0,1	37,5 – 39
Кошки	39,1±0,9	38,7±0,2	38 – 39,5
Частота сердечных сокращений, уд/мин			
Собаки	129,8±10,7	116,3±8	50 – 130
Кошки	169,0±22,6	156,8±20,5	160 – 180
Частота дыхательных движений, дв/мин			
Собаки	38,0±3,9	28,8±1,6*	14 – 26
Кошки	36,5±2,8	28,3±1*	20 – 30

Один из ключевых признаков эффективности терапии – нормализация или значительное снижение лихорадки в течение 24 – 48 часов после начала применения препарата. К 5-м суткам лечения температура тела, ЧСС и ЧДД

Таблица 2

Гематологические показатели крови собак

Показатель	Норма	Период эксперимента	
		До лечения	5-е сутки
Гематокрит, %	38 – 55	50±3,9	37,7±6,3*
Гемоглобин, г/л	120 – 180	177,5±21,9	137,4±14,8*
Эритроциты, ×10 ¹² /л	5,6 – 8	7,4±0,6	5,9±0,9
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, г/дл	33 – 38	355,9±17,6	367,6±21,3
Средний объем эритроцита, мкм ³	62 – 72,5	67,5±1,3	64,4±2,3
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	21 – 26	24,0±1,5	23,6±1,4
Лейкоциты, ×10 ⁹ /л	6 – 16	12,4±4,2	11,4±3,7
Нейтрофилы палочкоядерные, %	0 – 3	1,1±2,4	0,1±0,4
Нейтрофилы сегментоядерные, %	60 – 70	82,6±4,3	75,6±8,6*
Эозинофилы, %	0 – 5	1,1±1,7	1,0±2,0
Базофилы, %		0,13±0,35	0*
Моноциты, %	2 – 7	4,4±2,9	5,0±3,6
Лимфоциты, %	12 – 30	10,6±6	18,1±7,5
Тромбоциты, ×10 ⁹ /л	160 – 550	407,1±171,6	301,8±85,1

*p ≤ 0,05

Таблица 3

Гематологические показатели крови кошек

Показатель	Норма	Период эксперимента	
		До лечения	5-е сутки
Гематокрит, %	29 – 48	35,8±8,6	32,9±3,7*
Гемоглобин, г/л	90 – 150	121,8±31,6	115,6±16,3*
Эритроциты, ×10 ¹² /л	5,6 – 10	8,1±2,4	8,1±1,2
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, г/дл	29 – 36	338,5±15,1	351,3±259,3
Средний объем эритроцита, мкм ³	39 – 53	46,6±11,5	41,3±2,7
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	12,5 – 17,5	15,6±3,0	14,4±0,5
Лейкоциты, ×10 ⁹ /л	5,5 – 18,5	9,4±3,1	8,3±3,8
Нейтрофилы палочкоядерные, %	0 – 3	1,0±1,07	0*
Нейтрофилы сегментоядерные, %	35 – 75	86,8±5,3	71,3±6,7*
Эозинофилы, %	0 – 6	1,0±1,31	5,57±1,99*
Моноциты, %	1 – 4	3,5±3,38	2,57±3,74
Лимфоциты, %	25 – 55	7,6±2,1	20,3±2,7*
Тромбоциты, ×10 ⁹ /л	160 – 630	433,5±139,3	397,4±35,1

*p ≤ 0,05

пришли в норму, исчезли катаральные явления – носовые истечения и хрипы при аускультации.

Микробиологический анализ на 5-е сутки лечения показал полную элиминацию патогенной микрофлоры у всех подопытных животных ($p \leq 0,05$). Таким образом, основная цель антибактериальной терапии была достигнута.

Полученные результаты напрямую коррелируют с известными фармакокинетическими преимуществами азитромицина – его способностью накапливаться в бронхиальном секрете, слизистой оболочке бронхов, альвеолярной жидкости в концентрациях в десятки раз превышающих плазменные. Антибиотик локализуется преимущественно внутриклеточно, главным образом в лизосомах, альвеолярных макрофагах, нейтрофилах, моноцитах и фибробластах, при этом последние представляют собой наиболее объемный и стабильный резервуар препарата [1, 4]. Именно аккумуляция в фагоцитарных клетках обеспечивает эффективное подавление инфекции непосредственно в очаге воспаления [6]. Высокие тканевые концентрации азитромицина сохраняются длительное время после окончания приема, что объясняет стойкий клинический и бактериологический эффект даже при коротком 5-дневном курсе лечения.

В ходе эксперимента не фиксировали нежелательных реакций у животных на фоне применения препарата Азитронит Таб. И еще один плюс – диспергируемую таблетку можно легко растворить в небольшом количестве воды (5 – 10 мл) и ввести перорально животному с помощью шприца без иглы, что значительно упрощает процесс лечения для владельца.

Заключение. Показана высокая терапевтическая эффективность и безопасность препарата Азитронит Таб при ле-

чении собак и кошек с респираторными инфекциями. В дозе 10 мг/кг в течение пяти дней Азитронит Таб полностью купировал клинические симптомы заболеваний, нормализовал гематологические показатели, обеспечил эрадикацию патогенной микрофлоры из дыхательных путей. Уникальные фармакокинетические свойства азитромицина делают Азитронит Таб препаратом выбора для ротации при резистентности к β -лактамам, а удобная диспергируемая форма значительно облегчает процесс лечения мелких домашних животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Basualdo W., Arbo A. Randomized comparison of azithromycin versus cefixime for treatment of shigellosis in children. *Ped. Infect. Dis J.* 2003; 22:374 – 377.
2. Foulds G., Shepard R.M., Johnson R.B. The pharmacokinetics of azithromycin in human serum and tissues. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1990; 25(Suppl A):73 – 82.
3. Greene C.E. (ed.) *Infectious Diseases of the Dog and Cat.* 4th Edition. St. Louis: Elsevier Saunders, 2012; 1377.
4. Kitamura K., Kamiya H., Nakano T. et al. Pharmacokinetic and clinical evaluation of azithromycin in the pediatric field. *Jpn. J. Antibiot.* 1997; 50:206 – 214.
5. Lappin M.R. (ed.) *Feline Internal Medicine Secrets.* Philadelphia: Hanley & Belfus, 2001.
6. Lappin M.R., Blondeau J., Boothe D., Breitschwerdt E.B. et al. Antimicrobial use Guidelines for Treatment of Respiratory Tract Disease in Dogs and Cats: Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 2017; 31(2):279 – 294. DOI:10.1111/jvim.14627
7. Papich M.G. *Saunders Handbook of Veterinary Drugs.* 4th Edition. St. Louis: Elsevier, 2016.
8. Retsema J., Fu W. Macrolides: structures and microbial targets. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2001; 18(Suppl 1):S3 – S10.
9. Piscitelli S.C., Danziger L.H., Rodvold K.A. Clarithromycin and azithromycin: new macrolide antibiotics. *Clinical Pharmacy.* 1992; 11(2):137 – 152.
10. Plumb's *Veterinary Drugs Handbook.* [Электронный ресурс]. Ed. by D.C. Plumb. 9th Edition. Stockholm, Wisconsin: PharmaVet. 2018.
11. Prescott J.F., Baggot J.D., Walker R.D. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine.* 4th Edition. Ames: Wiley-Blackwell, 2000.
12. Weese J.S., Giguère S., Guardabassi L. et al. ACVIM consensus statement on therapeutic antimicrobial use in animals and antimicrobial resistance. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 2015; 29(2):487 – 498.

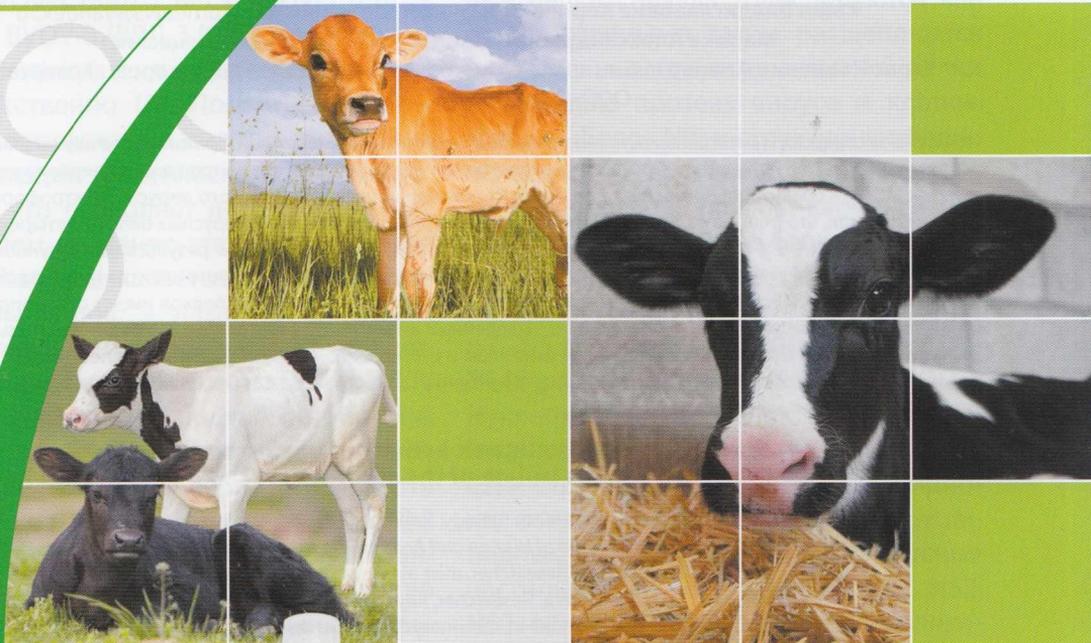
ХЮВЕФАРМА®

Парофор Сгурто

НОВИНКА!

Паромомицин

Препарат №1* в Европе
для лечения неонатальной диареи телят



НОВИНКА!



**Препарат выбора
при криптоспориidioзе телят**



**Антипротозойное
и антибактериальное действие**



Раствор быстрого действия



Удобное и точное дозирование

Парофор® Сгурто - зарегистрированная торговая марка ООО ХЮВЕФАРМА.



Представительство ООО ХЮВЕФАРМА (Болгария) в г. Москва
Россия, 115191, Москва, 4-й Рошинский проезд, дом 19
Телефон: +7(495) 958-56-56, 952-55-46, 633-83-64, факс: +7(495) 958-56-66
russia@huvepharma.com, www.huvepharma.com

* по данным исследования ХЮВЕФАРМА, вышедшего в печать в 2010 году

СПЕКТР И АНТИГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ БЕЛКОВ ИЗОЛЯТА МА-21 ВИРУСА ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ВТОРОГО ТИПА

Олег Анатольевич Верховский, д.б.н., профессор, президент, info@dpri.ru

АНО «Научно-исследовательский институт диагностики и профилактики болезней человека и животных» (г. Москва, Россия)

Ольга Александровна Чунихина, научный сотрудник, miss.akimova-olga2015@yandex.ru

Юлия Владиславовна Корнеева, научный сотрудник, julyacorneewa@yandex.ru

Марина Александровна Корицкая, к.в.н., ведущий специалист

Тарас Иванович Алипер, д.б.н., профессор, председатель совета директоров, aliper@vetbio.ru
ООО «Ветбиохим» (г. Москва, Россия)

Изучены экспрессия и антигенная активность белков ранее выделенного нецитопатогенного изолята МА-21 вируса вирусной диареи крупного рогатого скота второго типа (ВД 2а КРС) при его репродукции в перевиваемой линии клеток MDBK в сравнительном аспекте со спектром белков концентрированного вируса. Электрофоретический анализ показал, что репродукция возбудителя сопровождается экспрессией вирусных белков, четырех наиболее значимых из них – E^{ns}, NS4B, N^{ns} и С и трех дополнительных – NS2, E2 и E1. По результатам иммуноблоттинга с применением антисыворотки телят установили, что из представленного белкового спектра иммунодоминантными являются E2, NS4B, E^{ns} и E1. Известно, что спектр и антигенность различных белков имеют основополагающее значение для возможного включения вновь выделенных штаммов ВВД КРС в состав вакцин для повышения их эффективности по отношению к различным биотипам и субгенотипам вируса. **Ключевые слова:** вирус вирусной диареи крупного рогатого скота второго типа, структурные и неструктурные белки вируса, электрофорез, иммуноблоттинг, иммунный ответ.

Viral proteins and its antigenic activity of bovine viral diarrhoea virus isolate of the second type

O.A. Verkhovsky, PhD in Biology, Professor, President, info@dpri.ru

Institute for the Diagnosis and Prevention of Human and Animal Diseases (16 Gamalei Street, Moscow, 123098)

O.A. Chunikhina, Researcher, miss.akimova-olga2015@yandex.ru

Yu.V. Korneeva, Researcher, julyacorneewa@yandex.ru

M.A. Koritskaya, PhD in Veterinary Science, Lead microbiologist

T.I. Aliper, PhD in Biology, Professor, aliper@vetbio.ru
Vetbiochem Ltd

The aim of this article is to study of the expression and antigenic activity of proteins of the previously isolated non-cytopathogenic BVDV-2a strain MA-21 during its reproduction in the MDBK cell line in a comparative aspect with the protein spectrum of the concentrated virus. SDS-PAAGE analysis showed that virus reproduction accompanied by the expression of viral proteins, four of which are the most significant: E^{ns}, NS4B, N^{ns}, C, and three additional ones are the NS2, E2, and E1 proteins of the virus. According to the results of immunoblotting using calf antiserum, it was show that E2, NS4B, E^{ns}, and E1 are immunodominant proteins among the presented protein spectrum. It was discuss that the study of the spectrum and antigenicity of various proteins is fundamental for the possible inclusion of newly isolated BVDV strains in vaccines in order to increase their efficacy against various biotypes and subgenotypes of the BVDV. **Key words:** BVDV- 2a strain MA-21, viral structural and non-structural proteins, SDS-PAAGE, immunoblotting, immune response.
DOI:10.30896/0042-4846.2026.29.01.18-24.

Вирусная диарея (ВД, синоним: вирусная диарея-болезнь слизистых оболочек, ВД-БС) на протяжении последних десятилетий – одна из значимых болезней в инфекционной патологии крупного рогатого скота (КРС) [11]. Исторически возбудитель ее классифицирован как вирус диареи крупного ро-

гатого скота (Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV, ВВД КРС). Это одноцепочечный РНК-вирус из рода *Pestivirus* семейства *Flaviviridae*, подразделяют его на два генотипа (BVDV-1 и BVDV-2) и в зависимости от воздействия на инфицированные культуры клеток на цитопатогенный (цитопатический) и нецитопатогенный

(нецитопатический) биотипы. Генотипы в свою очередь подразделяют на различные подтипы/субгенотипы, генетическое и антигенное разнообразие которых влияет на диагностическое тестирование и вакцинацию [7, 14]. В настоящее время современная таксономия выделила возбудителей ВД КРС в отдельные виды пестивирусов и трактует BVDV-1 (ВВД 1 КРС), BVDV-2 (ВВД 2 КРС) и BVDV-3 (ВВД 3 КРС), как *Pestivirus bovis*, *Pestivirus tauri* и *Pestivirus brasilense* соответственно [8]. Логика современной классификации видов основана на информации генетического секвенирования, что позволяет добавлять новые виды. Тем не менее эта реорганизация рода *Pestivirus* касается только номенклатуры видов, а названия вирусных изолятов/штаммов не требуют изменения классического обозначения BVDV [20]. Разделение на подтипы и биотипы остается без изменений: так существует, по крайней мере, 21 субгенотип (1а–1и) ВВД 1 КРС и 4 субгенотипа (2а–2д) ВВД 2 КРС, при этом согласно опубликованным последовательностям количество изолятов ВВД 1 КРС (88,2 %) значительно выше, чем ВВД 2 КРС. Большинство выделенных изолятов ВВД 1 КРС (как и ВВД 2) являются нецитопатогенными, однако существуют и цитопатогенные штаммы.

Вирус ВД КРС всех типов имеет характерную для всех пестивирусов структуру и представляет собой оболочечный вирус сферической формы (диаметр 40 – 60 нм). Геном его состоит из одноцепочечной РНК положительной полярности, длиной 12,3 тыс. нуклеотидов (в результате рекомбинации длина может достигать 16,5 тыс.), кодирующей одну открытую рамку считывания (ORF). ORF кодирует четыре структурных и восемь неструктурных (NS) белков, которые фланкированы 5' и 3' большими

нетранслируемыми областями (UTR) [16]. Геном не имеет экзирования и при проникновении в клетку трансляция начинается с регуляторного участка IRES (англ. Internal Ribosome Entry Site, рус. участок внутренней посадки рибосомы – регуляторный участок мРНК эукариот и их вирусов), образованного высококонсервативной 5'-UTR. Вирусные белки сначала транслируются как полипротеины, а затем расщепляются на отдельные структурные и NS белки с помощью протеаз вируса и клетки-хозяина. Белок N^{pro} и структурные белки находятся на аминоконце полипротеина, а NS белки составляют карбоксиконцевую часть. Вирусные белки обозначаются последовательно: NH₂-N^{pro} (p20)-C(p14)-E^{ns}/E0(gp48)-E1(gp25)-E2(gp53)-p7-NS2(p54)-NS3(p80)-NS4A(p10)-NS4B(p30)-NS5A(p58)-NS5B(p75)-COOH. Нуклеокапсидный белок С и три гликопротеина оболочки (E^{ns}/E0, E1 и E2) – структурные компоненты вириона, соединяясь с геномной РНК и липидными бислоями, образуют вирусные частицы. NS белки вируса: N^{pro}, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A и NS5B являются компонентами ассоциированного с мембраной вирусного комплекса репликазы (РНК-зависимой РНК-полимеразы) и по отдельности или совместно участвуют в репликации, транскрипции и трансляции вируса.

В последние десятилетия стала понятна роль отдельных белков в биологии ВВД КРС и патогенезе пестивирусных инфекций. Установлено, что белки NS2 и NS3 возникают после расщепления полипротеина NS2-3, играющего ключевую роль в формировании инфекционных вирионов, для чего недостаточно NS2 и NS3 белков по отдельности. Расщепление полипротеина между NS2 и NS3 участком коррелирует со способностью вируса убивать восприимчивые клетки-

мишени (цитопатический эффект). Клеточные или вирусные вставки, делеции и даже точечные мутации приводят к экспрессии белка NS3 и, как следствие, к цитопатогенности возбудителя. Известный штамм NADL, американский прототип цитопатогенного ВВД КРС, содержит вставку из 270 нуклеотидов в гене NS2, которая усиливает расщепление полипротеина NS2-3, в результате чего появляется большое количество свободного белка NS3 [3]. В настоящее время принято считать, что, с одной стороны, пестивирусы животных антигенно родственны и практически идентичны по нуклеотидной последовательности, а с другой – существуют антигенные различия, обуславливающие природное разнообразие и биологические особенности отдельных штаммов ВВД КРС, информации о которых недостаточно. Все это подчеркивает необходимость продолжения исследований, направленных на изучение антигенных и других биологических особенностей вновь выделенных изолятов вируса.

В результате ранее проведенных исследований нами был выделен нецитопатогенный изолят МА23 вируса ВД 2 КРС, относящийся к субгенотипу 2а, который по своим молекулярным и биологическим свойствам отличается от изолятов вируса ВД КРС, известных на территории России и входящих в состав отечественных вакцин [2]. Цель данного исследования – изучить экспрессию и антигенную активность белков выделенного изолята при внутриклеточной репродукции вируса в восприимчивой культуре клеток в сравнительном аспекте со спектром белков концентрированного вируса.

Материалы и методы. В экспериментах использовали: 1 – перевиваемую культуру клеток MDBK, зараженную нецитопатогенным изолятом МА23 вируса

ВД 2а КРС, накапливающимся в титрах $5,5 - 6,5 \text{ Ig ККИД}_{50}/\text{мл}$; II – препарат концентрированного вируса с содержанием общего белка $0,1 \text{ мг/мл}$. Для определения титра вируса в культуре клеток применяли метод иммунопероксидазного окрашивания; скрининг образцов на наличие РНК вируса ВД КРС и дифференциации вирусов ВД 1, ВД 2 и ВД 3 КРС проводили с помощью полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» [1, 2].

Для получения специфической антисыворотки серонегативных телят черно-пестрой породы 4-месячного возраста ($n=30$) однократно внутримышечно иммунизировали изолятом МА-21 ВВД 2а КРС в дозе $10^{4,8} \text{ ККИД}_{50}$ в объеме 5 см^3 . Через два месяца у всех животных отбирали кровь и исследовали на специфическую активность по отношению к гомологичному и гетерологичному (ВВД 1 КРС) вирусам в реакции нейтрализации (РН) и иммуноферментным методом (ИФА). По результатам тестирования готовили объединенные пробы от телят с различным уровнем вирусспецифических антител. Постановку РН и ИФА осуществляли по стандартным и/или ранее описанным методикам [1, 2].

Спектр и антигенную активность белков нецитопатогенного изолята МА23 вируса ВД 2а КРС определяли в двух вируссодержащих образцах методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ПААГЭ-ДСН) и последующим иммуноблоттингом (ИБ) с использованием проб гомологичной антисыворотки телят. Пробы брали в разведениях 1:200 и 1:50 (в нескольких экспериментах). В качестве конъюгата для ИБ применяли меченные пероксидазой хрена антитела к IgG КРС в разведении 1:6000 (Sigma, США). При анализе полученных результатов учитывали длину пробега белка и сопоставляли ее

с молекулярной массой (М.м.) белков-маркеров (ThermoFisher Scientific, США) и известными литературными данными. Антигенную активность белков в ИБ оценивали по интенсивности окрашивания соответствующих полос, отражающей степень связывания в комплексе антиген-антитело.

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с помощью компьютерных программ Microsoft Office Excel 2007–2016 и статистических онлайн-калькуляторов [https://math.semestr.ru, https://medstatistic.ru].

Результаты исследований и обсуждение. В ранее проведенных экспериментах было показано, что спектр установленных белков нецитопатогенного изолята МА23 вируса ВД 2а КРС соответствовал таковым, характерным для всех пестивирусов. При этом антисыворотка, полученная гипериммунизацией кроликов, специфически окрашивала белок NS4В в препарате концентрированного

вируса. В настоящей работе представлены данные более углубленных исследований вирусных белков данного изолята, прежде всего оценка их экспрессии в восприимчивой культуре клеток (подобные результаты не найдены в литературе) в сравнительном аспекте по отношению к концентрированному вирусу. Для этого на первом этапе получили антисыворотки от 30 иммунизированных телят с различной степенью специфической активности в РН (титр от 1:8 до 1:256 по отношению к ВВД 1 КРС) и ИФА (A_{450} от 0,1 до 1,5 по отношению к ВВД 2 КРС). По результатам опыта приготовили четыре объединенные пробы, содержащие вирусспецифические антитела с различной активностью (рис. 1), которые в последующем использовали в ИБ для оценки степени связывания с индивидуальными белками (рис. 2).

Анализ результатов ПААГЭ-ДСН и ИБ свидетельствует о том, что репродукция изолята МА23 ВВД 2а КРС в перевиваемой культуре клеток MDBK (ЭФ*, рис. 2)

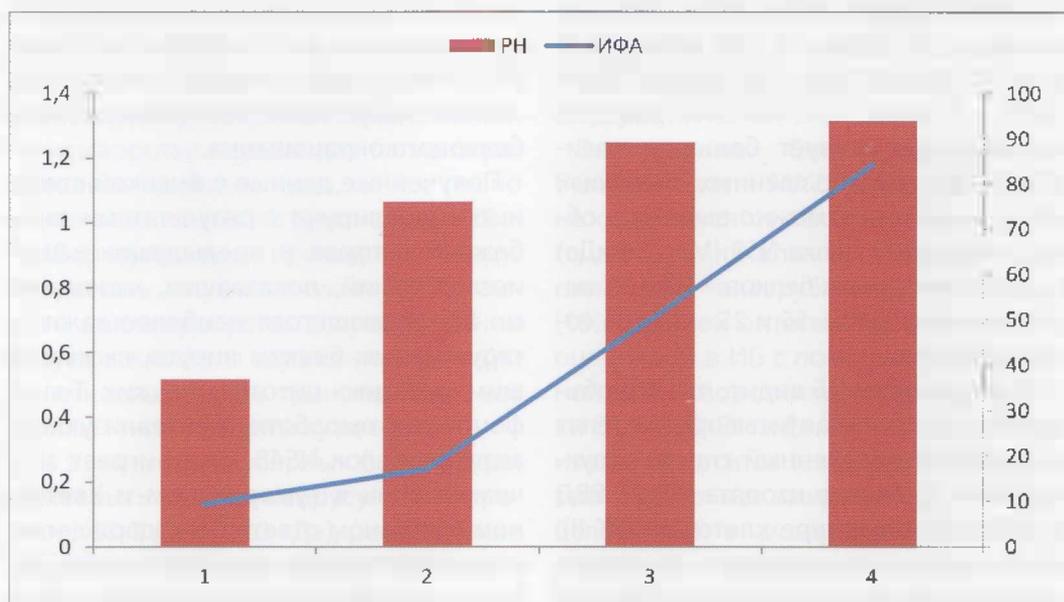


Рис. 1. Уровень вирусспецифических антител в объединенных пробах сывороток крови телят, иммунизированных изолятом МА-21 ВВД 2а КРС в дозе $10^{4,8}$ ККИД₅₀; по оси абсцисс – номер объединенной пробы; по оси ординат – средние геометрические значения A_{450} в ИФА (ось слева) и обратного титра вируснейтрализующих антител в РН (ось справа) в каждой объединенной пробе

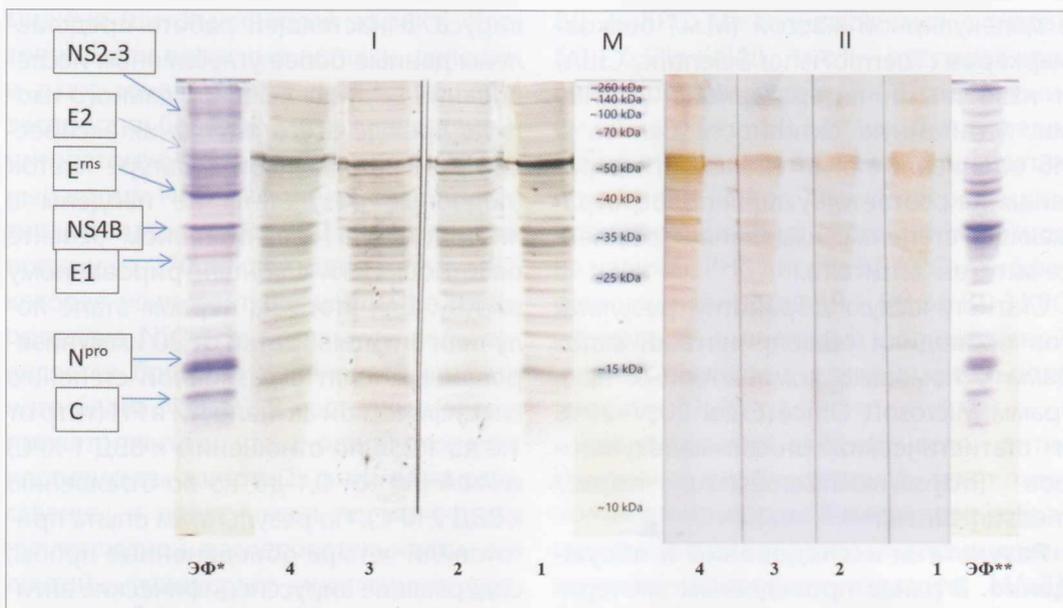


Рис. 2. Белки изолята MA-21 ВВД 2а КРС после проведения ПААГЭ-ДСН и их антигенная активность в иммуноблоттинге: ЭФ – окраска гелей 0,1%-ным раствором Кумасси ярко-голубого (СВВ R-350); М – белки-маркеры молекулярной массы; 4-3-2-1 – окраска мембран 0,05%-ным раствором 3,3'-диаминобензидина после взаимодействия с соответствующей пробой в разведении 1:200 и антивидовым конъюгатом. I – экспрессия белков вируса в переливаемой культуре клеток MDBK; II – спектр белков в концентрированном вирусе

сопровождается экспрессией вирусных белков. Четыре из них, наиболее ярко окрашенных, по своей электрофоретической подвижности могут быть отнесены к E^{ns} (М.м. 44 – 48 кДа), NS4B (М.м. 35 кДа), N^{pro} (М.м. 20 кДа) и С (М.м. 14 кДа). Помимо них на электрофореграммах присутствует большое количество других окрашенных белковых полос, из которых можно выделить область миграции белка NS2 (М.м. 54 кДа) и двух структурных белков – E2 и E1 вируса, имеющих М.м. 55 и 25 – 33 кДа соответственно.

По результатам ИБ видно, что все объединенные пробы антисыворотки телят выявляют определенный спектр структурных и NS белков изолята MA-21 ВВД 2а КРС как в культуре клеток MDBK (I), так и в концентрированном препарате вируса (II). Исходя из данных рисунка 2 (4 – 1), двумя основными иммунодоминантными белками испытываемого вируса являются структурный белок E2 и белок

NS4B, дающие максимально выраженные окрашенные полосы специфического связывания со всеми используемыми пробами. При увеличении концентрации вирусного антигена (II) и антител в ИБ (1:50) эти результаты оставались без изменений, усиливалась только степень белкового окрашивания.

Полученные данные с высокой степенью коррелируют с результатами зарубежных авторов и предыдущих наших исследований, показавших, что помимо E2, являющегося наиболее важным структурным белком вируса, вызывающим реакцию цитотоксических Т-лимфоцитов и выработку нейтрализующих антител, белок NS4B также играет значимую роль в гуморальном и клеточном иммунном ответе благодаря своим высококонсервативным эпитопам [18]. Роль гидрофобного белка NS4B, обладающего ферментативной активностью нуклеозидтрифосфатазы, в патогенезе ВД КРС была установлена сравнительно

недавно. Так благодаря взаимодействию между белками N^{pro} , E^{ns} и NS4B вируса и сигнальными путями иммунной системы хозяина ВВД КРС может блокировать иммунный ответ и вызывать хроническую форму болезни [15]. За рубежом в опыте на восприимчивых животных показана иммуногенная природа белка NS4B и его значение в возникновении цитопатогенности [5, 13]. Благодаря своей ключевой роли в процессе репликации вируса белок NS4B стал одной из основных мишеней для разработки новых средств диагностики, вакцинации и лечения человека при вирусных инфекциях. Результаты некоторых из них являются обнадеживающими, хотя до настоящего времени они клинически не одобрены [10, 12].

Помимо этих двух белков, окрашенные белковые полосы преимущественно локализованы в зоне М.м. 55 – 12 кДа: белки NS2, E1 и С вируса, которые также присутствовали в концентрированном вирусе (II). Степень их окрашивания была прямо пропорциональна специфической активности антисыворотки. При увеличении концентрации антигена и уменьшении разведения гомологичной антисыворотки первые два белка окрашивались наиболее ярко, но все равно менее интенсивно по сравнению с E2 и NS4B (результаты не приведены). Следует отметить, что в отличие от E^{ns} , играющего ключевую роль в прикреплении вируса к клетке и заражении, функции E1, относящегося к трансмембранным белкам I типа, изучены хуже всего.

Из высокомолекулярных белков один может быть отнесен к вирусу – полипротеин NS2-3 (М.м. 120 кДа), расщепление его по участку между NS2 и NS3 коррелирует со способностью ВВД вызывать цитопатический эффект в первичной и перевиваемой культурах клеток [3]. Отдельный белок NS3 (М.м. 80 кДа), проду-

цируемый цитопатогенными штаммами ВВД КРС, не обнаружили в настоящем эксперименте.

Возможно, нам впервые удалось показать низкомолекулярный белок N^{pro} – первый белок, образующийся из N-конца вирусного полипротеина и способный катализировать расщепление развивающихся полипротеинов с образованием белка С. Биологической особенностью N^{pro} является его способность контролировать выработку или ингибировать интерферон I типа после заражения хозяина, а также изменять склонность вируса к репликации [9, 17]. Некоторые белки остались неидентифицированными, вероятнее всего, они относятся к поверхностным белкам клеток MDBK, полученным в процессе культивирования вируса, что является биологической закономерностью, наблюдаемой при производстве вакцин [6]. На представленных электрофореграммах достоверных различий в экспрессии белков изолята MA-21 ВВД 2a КРС в перевиваемой культуре клеток MDBK (I) и спектре белков в концентрированном вирусосодержащем препарате (II) не наблюдали.

Заключение. Спектр выявленных белков изолята MA23 вируса ВД 2 КРС не отличается от такового характерного для других штаммов пестивирусов, описанных в зарубежной литературе [18]. Высокой антигенной активностью, оцененной в ИБ с помощью гомологичной антисыворотки телят, обладали белки E2, NS4B, E^{ns} и E1. Поскольку данный изолят относится к нецитопатогенному биотипу, то мы ожидаемо не выявили белок NS3 в моноварианте, присутствующий в цитопатогенных штаммах ВВД КРС. Несмотря на то что структурные и NS белки пестивирусов животных достаточно хорошо известны, нами впервые визуально продемонстриро-

вана экспрессия белков ВВД 2а КРС в процессе накопления в культуре клеток MDBK и показана важная роль белка NS4B во внутриклеточной репродукции пестивируса. Многофакторная природа вирулентности ВВД КРС подчеркивает необходимость изучения других, еще не исследованных факторов, связанных с антигенностью различных белков вируса, имеющих основополагающее значение для разработки эффективных вакцин и диагностических тестов против различных биотипов и субгенотипов вируса [4].

ЛИТЕРАТУРА

1. Акимова О.А., Южаков А.Г., Корицкая М.А., Иванов Е.В., Джавадова Г.А., Глотов А.Г., Глотова Т.И., Верховский О.А., Алипер Т.И. Выделение и идентификация вируса вирусной диареи крупного рогатого скота 3-го типа в животноводческом хозяйстве Российской Федерации. *Ветеринария*. 2021; 7:17 – 22.
2. Верховский О.А., Глотов А.Г., Чунихина О.А., Корицкая М.А., Баландина М.В., Иванов Е.В., Алипер Т.И. Молекулярно-биологические свойства изолята вируса вирусной диареи второго типа и вирусспецифический иммунный ответ. *Ветеринария*. 2025; 9:13 – 21.
3. Agarov E.V., Murray C.L., Frolov I., Qu L., Myers T.M., Rice C.M. Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhea virus. *J. Virol.* 2004; 78(5):2414 – 2425. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.5.2414-2425.2004>
4. Al-Kubati A.A.G., Kandeel M., Hussien J., Hemida M.G., Al-Mubarak A.I.A. Immunoinformatic prediction of the pathogenicity of bovine viral diarrhea virus genotypes: implications for viral virulence determinants, designing novel diagnostic assays and vaccines development. *Front Vet. Sci.* 2023; Jul 6; 10:1130147. DOI:10.3389/fvets.2023.1130147
5. Bashir S., Kossarev A., Martin V.C., Paeshuyse J. Deciphering the role of bovine viral diarrhea virus non-structural NS4B protein in viral pathogenesis. *Vet. Sci.* 2020; Oct 31; 7(4):169. DOI:10.3390/vetsci7040169
6. Euler K.N., Hauck S.M., Ueffing M., Deeg C.A. Bovine neonatal pancytopenia--comparative proteomic characterization of two BVD vaccines and the producer cell surface proteome (MDBK). *BMC Vet. Res.* 2013; Jan 23; 9:18. DOI:10.1186/1746-6148-9-18
7. Fulton R.W. Impact of species and subgenotypes of bovine viral diarrhea virus on control by vaccination. *Anim. Health Res. Rev.* 2015; Jun; 16(1):40 – 54. DOI:10.1017/S1466252315000079
8. International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV Official Taxonomic Resources. <https://ictv.global/>
9. Knappek K.J., Georges H.M., Van Campen H., Bishop J.V., Bielefeldt-Ohmann H., Smirnova N.P., Hansen T.R. Fetal Lymphoid Organ Immune Responses to Transient and Persistent Infection with Bovine Viral Diarrhea Virus. *Viruses*. 2020; Jul 28; 12(8):816. DOI:10.3390/v12080816
10. Li G., Adam A., Luo H., Shan C., Cao Z., Fontes-Garfias C.R., Sarathy V.V., Teleki C., Winkelmann E.R., Liang Y., Sun J., Bourne N., Barrett A.D.T., Shi P.Y., Wang T. An attenuated Zika virus NS4B protein mutant is a potent inducer of antiviral immune responses. *NPJ Vaccines*. 2019; Nov 28; 4:48. DOI:10.1038/s41541-019-0143-3
11. OIE Terrestrial Manual 2024. Chapter 3.4.7. Bovine viral diarrhea 3.04.07_BVD PDF (www.woah.org)
12. Pouliot J.J., Thomson M., Xie M., Horton J., Johnson J., Krull D., Mathis A., Morikawa Y., Parks D., Peterson R., Shimada T., Thomas E., Vamathevan J., Van Horn S., Xiong Z., Hamatake R., Peat A.J. Preclinical characterization and in vivo efficacy of GSK8853, a small-molecule inhibitor of the hepatitis C virus NS4B protein. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; Oct; 59(10):6539 – 6550. DOI:10.1128/AAC.00813-15
13. Qu L., McMullan L.K., Rice C.M. Isolation and characterization of noncytotoxic pestivirus mutants reveals a role for nonstructural protein NS4B in viral cytopathogenicity. *J. Virol.* 2001; Nov; 75(22):10651 – 10662. DOI:10.1128/JVI.75.22.10651-10662.2001
14. Ridpath J.F. Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: impact of biotype and genotype on U.S. control programs. *Prev. Vet. Med.* 2005; Nov 15; 72(1 – 2):17 – 30; discussion 215 – 9. DOI:10.1016/j.prevetmed.2005.08.003
15. Shan Y., Tong Z., Jinzhu M., Yu L., Zecai Z., Chenhua W., Wenjing H., Siyu L., Nannan C., Siyu S., Tongtong B., Jiang H., Biaohui B., Xin J., Yulong Z., Zhanbo Z. Bovine viral diarrhea virus NS4B protein interacts with 2CARD of MDA5 domain and negatively regulates the RLR-mediated IFN- β production. *Virus Res.* 2021 Sep; 302:198471. DOI:10.1016/j.virusres.2021.198471
16. Shanshan Chi, Si Chen, Weijuan Jia, Yunjiang He, Linzhu Ren, Xueli Wang. Non-structural proteins of bovine viral diarrhea virus. *Virus Genes*. 2022; 58:491 – 500. <https://doi.org/10.1007/s11262-022-01914-8>
17. Tautz N., Tews B.A., Meyers G. The Molecular Biology of Pestiviruses. *Adv. Virus Res.* 2015; 93:147 – 160. DOI:10.1016/bs.aivir.2015.03.002
18. Wang F.L., Deng M.C., Huang Y.L., Chang C.Y. Structures and Functions of Pestivirus Glycoproteins: Not Simply Surface Matters. *Viruses*. 2015; Jun 29; 7(7):3506 – 3529. DOI:10.3390/v7072783
19. Wang Y., Xie X., Shi P.Y. Flavivirus NS4B protein: Structure, function, and antiviral discovery. *Antiviral Res.* 2022; Nov; 207:105423. DOI:10.1016/j.antiviral.2022.105423
20. Walz P.H., Chamorro M.F., Falkenberg S.M., Passler T., van der Meer F., Woolums A.R. Bovine viral diarrhea virus: An updated American College of Veterinary Internal Medicine consensus statement with focus on virus biology, hosts, immunosuppression, and vaccination. *J. Vet. Intern. Med.* 2020; Sep; 34(5):1690 – 1706. DOI:10.1111/jvim.15816

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФЕНБЕНДАЗОЛА И *BACILLUS SUBTILIS* У ЛОШАДЕЙ ПРИ СТРОНГИЛИДОЗАХ

Фёдор Иванович Василевич, д.в.н., профессор, академик РАН, f-vasilevich@inbox.ru
ФГОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии –
МВА имени К.И. Скрябина» (109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д. 23)

Ольга Владимировна Дёмкина, к.в.н., доцент, demkina-olsen@mail.ru
ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный аграрный университет»
(675005, г. Благовещенск, ул. Политехническая, д. 86)

Анна Михайловна Никанорова, д.в.н., доцент, nikanorovaam@tksu.ru
ФГБОУ ВО «Калужский государственный университет
имени К.Э. Циолковского» (248023, г. Калуга, ул. Степана Разина, д. 26)

Циатостомины остаются значимой проблемой в коневодстве, которая усугубляется снижением чувствительности гельминтов к бензимидазолам (традиционным антигельминтным препаратам). Пробиотики на основе *Bacillus subtilis* рассматривают как способ усилить и пролонгировать действие препаратов. Представлены результаты двухэтапного эксперимента, проведенного в полевых условиях на лошадях со сниженной чувствительностью к бензимидазолам. Сравнивали эффективность терапии фенбендазолом (однократно) и сочетанием фенбендазола (однократно) и *B. subtilis* в течение 14 дней. Результаты оценивали по снижению числа яиц в фекалиях (тест FECRT) с ДИ. Дополнительно подсчитывали среднее \pm SE, медиану [Q1–Q3] и долю животных с EPG=0. Установили, что фенбендазол (ФБЗ) в монотерапии дал краткосрочный результат с последующим рецидивом. ФБЗ с *B. subtilis* в сочетании обеспечивал быстрое и устойчивое подавление выделения яиц стронгилид животными до 30 дней, снижая тем самым интервалы между обработками лошадей и контаминацию пастбища. **Ключевые слова:** лошади, циатостомины, стронгилиды, фенбендазол, *Bacillus subtilis*, пробиотик, FECRT, бензимидазол-резистентность.

The effectiveness of combined use of fenbendazole and *Bacillus subtilis* in horses with benzimidazole-resistant strongylids

F.I. Vasilevich, PhD in Veterinary Science, Professor, Academician the RAS,
Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MBA named after K.I. Skryabin
(23 Academician Skryabin St., Moscow, 109472)

O.V. Demkina, PhD in Veterinary Science, Assistant professor
Far Eastern State Agrarian University (86 Polytechnicheskaya St., Blagoveshchensk, Amur Region, 675005)

A.M. Nikanorova, PhD in Veterinary Science, Assistant professor
Kaluga State University named after K.E. Tsiolkovsky (26 Stepana Razina st., Kaluga, Kaluga region, 248023).

Cyathostomines remain a significant problem in horse breeding, which is aggravated by a decrease in the sensitivity of helminths to benzimidazoles (traditional anthelmintic drugs). Probiotics based on *Bacillus subtilis* are considered as a way to enhance and prolong the effect of drugs. The results of a two-stage experiment conducted in the field on horses with reduced sensitivity to benzimidazoles are presented. The efficacy of therapy with fenbendazole (once) and a combination of fenbendazole (once) and *B. subtilis* for 14 days was compared. The results were evaluated by reducing the number of eggs in faeces (FECRT test) with DI. Additionally, the mean \pm SE, median [Q1–Q3], and the proportion of animals with EPG=0 were calculated. It was found that fenbendazole (FBZ) in monotherapy gave a short-term response followed by relapse. The combination of FBZ with *B. subtilis* ensured rapid and sustained suppression of the release of strongylid eggs by animals for up to 30 days, thereby reducing pasture contamination and allowing longer treatment intervals. **Key words:** horses, cyathostomins, strongylids, fenbendazole, *Bacillus subtilis*, probiotic, FECRT, benzimidazole resistance. DOI:10.30896/0042-4846.2026.29.01.25-30

Гельминтозы лошадей, причина которых нематоды семейства *Strongylidae* (прежде всего *Cyathostominae*), – одна из ключевых проблем коневодства. Хроническая инвазия снижает работоспособность, нарушает функции желу-

дочно-кишечного тракта, поддерживает постоянное загрязнение пастбищ яйцами и личинками. На фоне многолетнего применения бензимидазолов, включая фенбендазол (ФБЗ), во многих хозяйствах отмечают лекарственную устойчи-

вость возбудителя к препарату [1]. Это снижает результативность стандартных схем дегельминтизации и усложняет противоэпизоотические мероприятия.

В качестве одного из подходов повышения эффективности терапии рассматривают комбинирование антигельминтиков с пробиотиками на основе *Bacillus subtilis*, безопасных даже в высоких дозах [8, 13], способных модулировать кишечную микробиоту и местный иммунный ответ хозяина [2, 4]. Их используют как потенциальный адъювант антигельминтной терапии [10, 11]. Однако, клинических полевых данных, подтверждающих эффективность и устойчивость антигельминтного эффекта комбинации *B. subtilis* с фенбендазолом при стронгилидозах лошадей, недостаточно [5].

Цель работы – в условиях хозяйства оценить эффективность фенбендазола и *Bacillus subtilis* (штамм ВКПМ В-10641 (DSM 24613) при совместном применении для лечения лошадей со стронгилидозом.

Материалы и методы. Опыты провели на базе конного хозяйства «Контур» в Амурской области. Животных подбирали с признаками сниженной чувствительности к бензимидазолам. В задачу исследований входило сравнить динамику выделения яиц стронгилид в группах комбинированного лечения и интактной; оценить долю животных, не выделяющих яйца, и снижение числа яиц в фекалиях; охарактеризовать устойчивость антигельминтного эффекта во времени. Лошадей содержали стойлово-выгульным методом. В зимний период рацион состоял из сена, овса и воды, в летний период – свободный выпас на местных пастбищах с неограниченным доступом к воде. Массу тела животных определяли по формуле INRA с использованием измерительной ленты [6].

В апреле 2022 г. протестировали антигельминтную эффективность ФБЗ и убедились в наличии резистентности к нему, а в апреле 2023 г. на тех же животных провели контролируемое сравнение разных схем обработки. Дату начала эксперимента и взятия материала для исследований принимали как 0-й день. Критерии включения животных в опыт: лошади смешанных пород от 6 до 15 лет, индивидуальная паразитарная нагрузка ≥ 50 яиц стронгилид/г⁻¹ фекалий на 0-й день, отсутствие противогельминтного лечения в течение предыдущих 12 недель. Эксперимент состоял из двух этапов: на первом в апреле 2022 г. на подобранной группе из 28 голов, так называемом «положительном» контроле (ПК), оценивали эффективность ФБЗ и наличие признаков резистентности. Животные однократно орально получали базовый фенбендазол 97 % (ФБЗ) в дозе 7,5 мг/кг. Препарат смешивали с 1 кг овса. В последующие 14 дней лошади получали 1 кг овса без добавок.

Второй этап опыта в апреле 2023 г. провели на этих же 28 лошадях, которых разделили на две группы по 14 голов в каждой: опытную «Комбо» и группу «отрицательного» контроля (ОК). Распределяли животных по группам так, чтобы не было различий по числу яиц на 1 грамм фекалий (EPG) на 0-й день (тест Крускала-Уоллиса). Отбор фекалий и подсчет яиц стронгилид осуществляли без ослепления на 0-, 10-, 14-, 21- и 30-й день опытов. Показатель снижения числа яиц в фекалиях (СЧЯ) оценивали как индивидуальный EPG для каждой головы. Лошадям группы Комбо, помимо 7,5 мг/кг ФБЗ в 0-й день, дополнительно, с 0-го по 14-й день скармливали *B. subtilis* в виде порошка со спорами (не менее 1×10^8 КОЕ/г). Доза пробиотика 50 мг/кг для лошади массой тела 500 кг составила 25 г порошка ($2,5 \times 10^9$ КОЕ/сут.).

Пробиотик смешивали с увлажненным овсом непосредственно перед скормливанием. Животные группы ОК получали корм без антигельминтиков и пробиотиков.

Яйца из фекалий лошадей выделяли методом флотации с раствором нитрата натрия плотностью 1,4 [7]. Яйца *Strongylidae gen. spp.* идентифицировали по морфологическим показателям [9]. Их количество в 1 г фекалий (EPG) считали в трех повторах в камере Мак-Мастера с мультипликатором 25 (аналитическая чувствительность 25 EPG). Основной показатель терапевтической эффективности – результаты теста FECRT (fecal egg count reduction test), то есть % снижения числа яиц относительно исходного уровня на контрольные сутки. Критерий эффективности: FECRT ≥ 95 % и нижняя граница 95 % доверительного интервала (ДИ) ≥ 90 % [12]. Значения FECRT (%) рассчитывали относительно 0-х суток для одних и тех же лошадей. Доверительные интервалы 95 % получали непараметрическим методом повторной выборки (бутстреп). Дополнительно рассчитывали экстенсивность (ЭЭ и % животных с EPG=0).

При статистической обработке результатов число яиц/г фекалий описывали медианой (IQR) и средним значением $(X) \pm SE$. Для сравнения «до-после» внутри группы использовали критерий Уилкоксона для парных наблюдений, межгрупповые сравнения в фиксированные дни проводили методом Ман-

на-Уитни. Уровень значимости – $\alpha=0,05$ (двусторонний). Статистический анализ выполнен в среде *Python* с применением стандартных пакетов для описательной статистики, непараметрических критериев и построения графиков.

Результаты исследований и обсуждение. На первом этапе эксперимента в 2022 г. фенбендазол (группа ПК) к 10-му дню после обработки резко снизил число яиц, выделяемых в фекалиях лошадей, ЭЭ равнялась 64,3 %, но начиная с 14-го дня этот показатель снижался и на 21- и 30-й день составлял 0 %. Одновременно росли средние значения EPG. Фенбендазол (группа ПК, 2022 г.) при монотерапии привел лишь к кратковременному снижению экскреции яиц с быстрым восстановлением до исходного уровня к 30-м суткам (FECRT=18 %), что подтвердило наличие резистентности.

На втором этапе эксперимента комбинированная терапия (группа Комбо, 2023 г.) показала высокую и пролонгированную эффективность. У лошадей группы Комбо не регистрировали яйца стронгилид на 21-й день (ЭЭ=100 %) и только к 30-м суткам наблюдений выявили единичные яйца у двух голов (ЭЭ=85,7%). В контрольной группе (ОК) среднее число яиц оставалось стабильно высоким с тенденцией к росту (табл. 1).

По медиане начальные уровни инвазированности лошадей разных экспериментальных групп были сопоставимы. На 0-е сутки медиана в группе ОК составила 110 при межквартильном размахе

Таблица 1
Среднее число яиц/г фекалий в экспериментальных группах

Группа	Дни наблюдений				
	0-й	10-й	14-й	21-й	30-й
ПК	189,1 \pm 26,63	14,9 \pm 5,4	38,7 \pm 12,3	127,3 \pm 16,1	156,0 \pm 18,8
Комбо	127,1 \pm 40,26	0	0	0	0,9 \pm 0,7
ОК	129,1 \pm 21,51	133,4 \pm 27,2	167,4 \pm 26,6	160,9 \pm 26,4	164,9 \pm 31,6

Значения теста FECRT с 95 % ДИ в различные дни опыта

Группа, парные размеры выборок	FECRT, % (ДИ 95 %) в дни наблюдений		
	14-й	21-й	30-й
Комбо	100 (100 – 100 %)	100 (100 – 100 %)	99 (97 – 100 %)
ПК	80 (63 – 91 %)	33 (1 – 55 %)	18 (-23 – 43 %)
ОК	-30 (-107 – 17 %)	-25 (-91 – 18 %)	-28 (-118 – 26 %)

[Q1 – Q3] – 74 – 184; у лошадей ПК группы – 164 и 84 – 262, в группе Комбо – 58 и 38 – 179. По критерию Крускала–Уоллиса различий не выявили ($\chi^2=4,17$; $p=0,124$), что позволило в дальнейшем корректно сравнивать динамику изменений между группами.

Эффективность дегельминтизации оценивали по тесту снижения числа яиц в фекалиях (FECRT) в соответствии с рекомендациями Всемирной ассоциации содействия развитию ветеринарной паразитологии (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, WAAVP). FECRT рассчитывали, как процентное уменьшение среднего EPG у одних и тех же животных на 14-, 21- и 30-е сутки по сравнению с 0-ми сутками. Для каждого значения определяли 95%-ный доверительный интервал (95 % ДИ). Лечение расценивали как эффективное, если одновременно выполнялись два условия: FECRT \geq 95 % и нижняя граница 95 % ДИ \geq 90 %. В нашем опыте динамика EPG и показатель FECRT на 14-, 21- и 30-й день (табл. 2) отражали устойчивое снижение числа яиц стронгилид в фекалиях животных группы Комбо, низкую эффективность дегельминтиза-

ции в группе ПК и рост количества выделяемых яиц в контрольной группе (ОК).

В группе Комбо 100 % эффективность сохранялась до 21-го дня, к 30-му дню она составила 99 %. Отрицательные значения FECRT в группе ОК говорят о естественном увеличении паразитарной нагрузки за время эксперимента.

На рисунке 1 линиями обозначены медианы (IQR) EPG для экспериментальных групп животных на каждую дату отбора проб (0-, 14-, 21- и 30-й день).

Видно, что в группе Комбо медиана EPG, равная 0, сохранялась с 14-го по 30-й день; в группе ПК число яиц к 14-му дню также снижалось до 0, затем оно начало расти и к 21 – 30-му дню почти достигало исходного уровня. У лошадей ОК эти показатели оставались высокими.

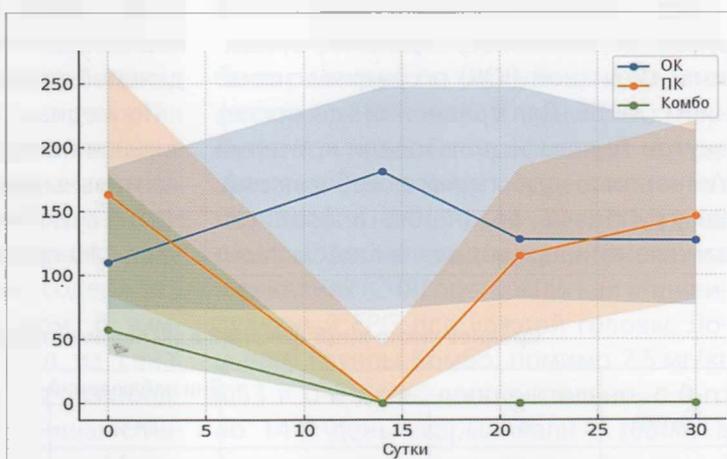


Рис. 1. Динамика медианы (IQR) EPG стронгилид у лошадей: полупрозрачные ленты показывают межквартильный размах (IQR), по оси X – дни после начала лечения, по оси Y – медиана яиц в 1 г фекалий (EPG)

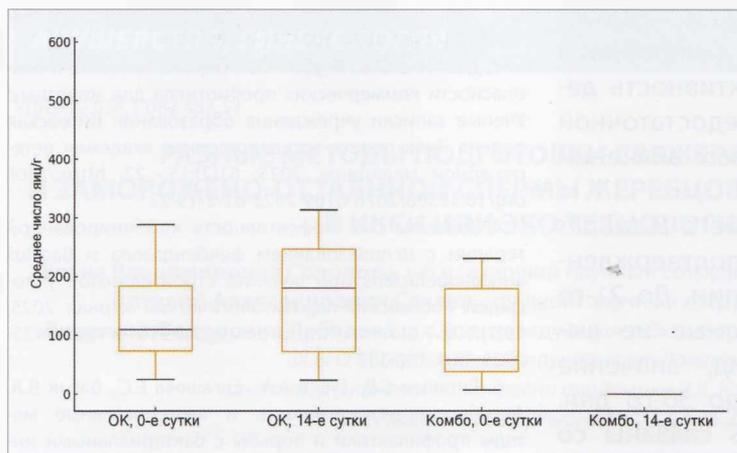


Рис. 2. Число яиц *Strongylidae* в 1 г фекалий лошадей групп ОК и Комбо: средняя линия – медиана; прямоугольники – межквартильный размах (IQR); усы – 1,5 × IQR; отдельные точки – выбросы

Распределение яиц *Strongylidae* у животных контрольной группы без лечения (ОК) и получавших комбинацию фенбендазола и пробиотика (Комбо) в основные контрольные точки (0- и 14-й дни) представлено на диаграмме «боксплот» (рис. 2).

Медиана EPG в группе Комбо к 14-му дню снизилась с 58 EPG до 0, в то время как в группе ОК выросла со 110 до 181 EPG. По значению EPG различия в эффективности терапии оказались статистически значимыми: U-тест Манна-Уитни на 14-й день – $p=8,4 \times 10^{-7}$, на 21/30 – $p < 0,001$.

Таким образом, признаки резистентности стронгилид к фенбендазолу проявились быстрым восстановлением интенсивности инвазии после кратковременного снижения среднего числа яиц/г фекалий. Сочетание фенбендазола с *B. subtilis* продлило и усилило антигельминтное действие препарата, что подтверждено полным отсутствием яиц стронгилид в пробах фекалий до 21-го дня и минимальным их количеством на 30-й день. В контрольной группе устойчивый уровень инвазии сохранялся. Сопоставимость исходных данных зараженности и выявленные значимые

статистические различия между группами указывают на наличие потенциала в совместном применении антигельминтиков и пробиотиков на основе *B. subtilis*.

М.К. Nielsen et al. отмечали, что во многих странах мира снижается эффективность фенбендазола из-за развития резистентности у популяций цистостомин [13]. Аналогичные

проблемы отмечены в российских конных хозяйствах: тесты на снижение количества яиц часто показывали результаты ниже порога WAAVP в 90 – 95 % [1]. Это еще раз подчеркивает острую необходимость чем-то дополнить существующие мероприятия по борьбе с гельминтозами лошадей.

В качестве потенциальных адьювантов в антигельминтной терапии рассматривают, в частности, пробиотические бактерии рода *Bacillus* [11]. Результаты опытов, представленные нами в этой статье, подтверждают гипотезу, что *B. subtilis* способна усилить и продлить терапевтический эффект фенбендазола при паразитировании резистентных стронгилид у животных. О.В. Дёмкина в своих более ранних работах описала результаты терапии естественно инвазированных стронгилидами лошадей фенбендазолом в сочетании с *Bacillus amyloliquefaciens* [4]. Было показано, что в сравнении с монотерапией фенбендазолом лошади меньше в среднем выделяли яиц и реинвазия у них развивалась медленнее. Но статистической значимости эти различия не достигли. Биологическое действие проявлялось снижением среднего числа яиц при

повторном заражении и исчезновением *Aspergillus* spp. из микробиоты кишечника. Общая эффективность дегельминтизации была недостаточной для достижения пороговых значений WAAVP.

Настоящее исследование с *B. subtilis* показало статистически подтвержденную эффективность терапии. До 21-го дня исследований животные не выделяли яйца стронгилид, значение FECRT > 95 % оставалось до 30-го дня. Эти отличия могут быть связаны со штаммоспецифическими свойствами *Bacillus* spp. и с методикой эксперимента. Сами по себе пробиотические добавки не в состоянии заменить антигельминтную терапию, но определенные штаммы *Bacillus* способны значительно усилить и продлить эффективность бензимидазолов в отношении резистентных популяций нематод. Это дает основания начать разрабатывать комплексные протоколы лечения, сочетающие традиционные антигельминтные препараты с пробиотической поддержкой.

Заключение. Фенбендазол в комбинации с *Bacillus subtilis* (штамм ВКПМ В-10641) обеспечил эффективный пролонгированный антигельминтный эффект (до 30 суток) у лошадей со стронгилидозом, возбудитель которого устойчив к бензимидазолам. Для оптимизации протоколов лечения необходимы дальнейшие исследования, уточняющие механизм синергизма и выявляющие маркеры резистентности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арисов М.В., Панова О.А., Баранова М.В., Сысоева Н.Ю. и др. Риск развития резистентности к антигельминтным препаратам у стронгилид лошадей Московской области. Ветеринария. 2022; 5:39 – 44. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2022.25.5.39-44>
2. Василевич Ф.И., Бачинская В.М., Шапапова Н.Р., Гурьева В.И. Эффективность пробиотических кормовых добавок для профилактики кишечных инфекций. АПК России. 2024; 31(4):569 – 579. <https://doi.org/10.55934/2587-8824-2024-31-4-569-579>
3. Дёмкина О.В., Якубик О.Л. Оценка качества и безопасности коммерческих пробиотиков для животных. Ученые записки учреждения образования Витебская академия ветеринарной медицины. 2025; 61(2):15 – 22. <https://doi.org/10.52368/2078-0109-2025-61-2-15-22>
4. Дёмкина О.В. Эффективность комбинированной терапии с использованием фенбендазола и *Bacillus amyloliquefaciens* при лечении стронгилятозов у лошадей. Российский паразитологический журнал. 2025; 19(1):108 – 117. <https://doi.org/10.31016/1998-8435-2025-19-1-108-117>
5. Енгашев С.В., Гусев А.А., Енгашева Е.С., Бабак В.А. Антибиотикорезистентность и альтернативные методы профилактики и борьбы с бактериальными инфекциями. Ветеринария. 2021; 5:30 – 34. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2021.24.5.30-34>
6. Кокколова М.Л., Гаврильева Л.Ю., Прибылых Е.И., Попова Н.В. Профилактика и лечение паразитарных болезней лошадей табунного содержания в начале холодного периода в Якутии. Ветеринария и кормление. 2024; 2:35 – 39. <https://doi.org/10.30917/att-vk-1814-9588-2024-2-8>
7. Коробчук М.В. Аналитический обзор косвенных методов оценки живого веса лошади. Журнал Science Time. 2019; 2:72 – 94.
8. Панова О.А., Курносоева О.П., Хрусталева А.В., Арисов М.В. Методы копрологической диагностики паразитозов животных. Российский паразитологический журнал. 2023; 17(3):365 – 377. <https://doi.org/10.31016/1998-8435-2023-17-3-365-377>
9. Салкова Д., Панайотова–Пенчева М., Мовсесян С., Бейер С. и др. Альтернативные методы борьбы с паразитарными болезнями животных. Российский паразитологический журнал. 2014; 1:93 – 103.
10. Cernea M., de Carvalho M.L.M., Vasile C. Atlas of diagnosis of equine strongylidosis, 2008; 123 p.
11. Cruz C.S., França W.W.M., de Araújo H.D.A., Ximenes E.C.P. et al. In vitro and in vivo evaluation of *Bacillus clausii* against *Schistosoma mansoni*. Acta Tropica. 2022; 235: 106669. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106669>
12. Hu Yan, Miller M., Zhang Bo, Nguyen T.T. et al. In vivo and in vitro studies of Cry5B and nicotinic acetylcholine receptor agonist anthelmintics reveal a powerful and unique combination therapy against intestinal nematode parasites. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2018; 12(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006506>
13. Nielsen MK., von Samson-Himmelstjerna G., Kuzmina T. A., van Doorn D.V. et al. World association for the advancement of veterinary parasitology (WAAVP): Third edition of guideline for evaluating the efficacy of equine anthelmintics. Veterinary Parasitology. 2022; 303: 109676. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2022.109676>
14. Jacobs R.D., Jerina M.L., Tremayne B.A. 102 Probiotic administration post-foaling may reduce parasite shedding in foals. Journal of Equine Veterinary Science. 2021; 100:103565. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103565>

РАЗНЫЕ МЕТОДЫ ПОДГОТОВКИ СВЕЖЕРАЗБАВЛЕННОЙ И ЗАМОРОЖЕНО-ОТТАЯННОЙ СПЕРМЫ ЖЕРЕБЦОВ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ИКСИ ИЛИ ЭКО ТЕХНОЛОГИЯХ

Елена Владимировна Солодова, к.б.н., старший научный сотрудник, l.solodowa2012@yandex.ru
Виталий Александрович Сакаев, младший научный сотрудник, kotiklusik@mail.ru
Людмила Федоровна Лебедева, д.с.-х.н., заведующая лабораторией, Lebedeva-L-18@yandex.ru
*ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства имени академика В.В. Калашникова»
 (391105, Рязанская обл., Рыбновский р-н, п. Дивово)*

Определяли оптимальный метод подготовки спермы жеребцов для интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в яйцеклетку (ИКСИ) и экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Оценивали показатели общей и прогрессивной подвижности сперматозоидов после применения методик всплытия (Direct Swim-Up, DSU), центрифугирования в градиенте плотности (Density gradient centrifugation, DGC) и их комбинации (DGC-DSU). Испытания провели на образцах свежеразбавленной (n=16) и замороженной (n=12) спермы жеребцов. Для методики Swim-Up использовали среду G-MOPS™, для DGC – градиент SpermGrad™. Наилучшие результаты по увеличению прогрессивной подвижности сперматозоидов достигали с помощью методов DGC или DGC-DSU, как на свежеразбавленной (в 1,5 раза), так и заморожено-оттаянной сперме (в 2,7 и 2,5 раза соответственно). Метод DSU (Swim-Up) достоверно увеличивал прогрессивную подвижность гамет только в заморожено-оттаянных образцах. Следовательно, если для подготовки к ИКСИ планируют применить метод DSU, то использовать можно как свежеразбавленную, так и заморожено-оттаянную сперму. При подготовке образцов заморожено-оттаянной спермы методом DSU уровень прогрессивной подвижности сперматозоидов составлял 33,8%, этого недостаточно для процедуры ЭКО. Поэтому для проведения ЭКО необходимо использовать методы DGC или DGC-DSU. **Ключевые слова:** сперма, подвижность, методы подготовки, ЭКО, ИКСИ.

Preparation of freshly diluted and frozen-thawed stallion sperm by various methods for use in ICSI or IVF technologies

E.V. Solodova, PhD in Biology, Senior researcher, l.solodowa2012@yandex.ru

V.A. Sakaev, Junior research, kotiklusik@mail.ru

L.F. Lebedeva, PhD in Agriculture, Head of laboratory, Lebedeva-L-18@yandex.ru

*The All-Russian Research Institute for Horse Breeding named after
 V.V. Kalashnikov (391105, Ryazan region, Rybnovsky district, Divovo)*

In order to determine the optimal method of stallion sperm preparation for ICSI and IVF, studies were conducted on changes in the indicators of total and progressive motility after using the following methods: direct swim-up (DSU), density gradient centrifugation (DGC) and their combination (DGC-SU). The samples of freshly diluted (n=16) and frozen (n=12) stallion sperm were analyzed. The G-MOPS™ medium was used for the Swim-Up method, and the SpermGrad™ gradient was used for DGC. The studies showed that the best results in increasing the progressive motility of spermatozoa are achieved using the DGC or DGC-SU methods, both when using freshly diluted (1,5 times) and frozen-thawed sperm (2,7 and 2,5 times, respectively). A reliable increase in progressive motility (1,7 times) after sperm preparation using the Swim-Up method is achieved only in frozen-thawed sperm samples. Thus, to prepare sperm for ICSI, the DSU method can be used for both freshly diluted and frozen-thawed sperm samples. The level of progressive motility 33,8% (17,4 – 42,4%) after preparation of frozen-thawed sperm samples by the DSU method is not sufficient for use in the IVF procedure, therefore, to perform IVF with a frozen-thawed sperm sample, it is necessary to use the DGC or DGC-SU method. **Key words:** sperm, motility, preparation methods, IVF, ICSI.

DOI:10.30896/0042-4846.2026.29.01.31-35

Одним из определяющих этапов успешного проведения процедуры интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в яйцеклетку (ИКСИ) или экстракорпорального оплодотворения

(ЭКО) является подготовка спермы. Отделение сперматозоидов от семенной плазмы для отбора наиболее жизнеспособных, так же как и выбор готовых к оплодотворению ооцитов, мож-

но проводить различными способами. Из них наиболее распространенными протоколами в лабораториях вспомогательных репродуктивных технологий (BPT) являются метод всплытия (Direct Swim-Up, DSU), центрифугирование в градиенте плотности (DGC), их комбинация (DGC-DSU) и метод микрофлюидной сортировки (MF) [1, 8, 9, 11]. DSU и DGC широко используют из-за простоты и экономической эффективности [1, 8]. Процедура всплытия основана на присутствии сперматозоидам прогрессивной подвижности, позволяющей им подниматься вверх через среду в течение 30 – 60 минут. В итоге верхняя фракция спермы содержит высокоподвижные, морфологически нормальные сперматозоиды, с неповрежденной ДНК, без посторонних клеточных и белковых включений [5].

Метод DGC работает путем наложения в центрифужной пробирке образца спермы на коллоидный градиент одинарной или двойной плотности (непрерывный или прерывистый). Центрифугирование с умеренным усилием 300 – 600 g в течение 15 – 30 мин обеспечивает прохождение через градиент и разделение сперматозоидов высокого и низкого качества. При двойном градиенте плотности в верхнем, менее плотном, слое остаются более крупные макромолекулы, лейкоциты и другой нежелательный клеточный дебрис. Зрелые сперматозоиды легко проходят через верхний градиент, а при достижении второго, более плотного коллоидного слоя морфологически нормальные гаметы, обладающие большей плотностью и ориентированные головкой вниз, проходят по градиенту коллоидного кремния и в процессе центрифугирования на дне пробирки образуют гранулы. Наиболее распространен-

ный градиент, используемый в животноводстве, – Percoll[®], однако, он имеет потенциальные воспалительные, ультраструктурные и эндотоксические эффекты частиц кремнезема, покрытых поливинилпирролидоном (ПВП), которые связаны с фрагментацией цитоплазмы и ухудшением развития эмбрионов [2]. При размножении лошадей распространенной заменой Percoll[®] стал EquiPure[™], центрифугирование с которым улучшают подвижность и морфологию клеток, а также частоту наступления беременности. В настоящее время также используют коммерческие препараты PureSperm[™] (Швеция), Isolate[™] (США) и SupraSperm[™] (Дания).

Самым перспективным методом, дающим наилучшие результаты, является микрофлюидная сортировка (MF). Он позволяет отбирать высокоподвижные сперматозоиды на основе рео-, хемо- и термотаксиса жизнеспособных, одновременно удаляя посторонний клеточный дебрис. Существуют различные устройства MF, которые зависят от способности высокоподвижной субпопуляции сперматозоидов проплывать через пористую мембрану или через комбинацию каналов и коллекторных камер. Этот метод не требует центрифугирования, в процессе которого возможно повреждение сперматозоидов, обеспечивает получение популяции, обогащенной гаметами с нормальной морфологией, улучшенной подвижностью, жизнеспособностью и целостной ДНК, с меньшим образованием активных форм кислорода [4, 6].

Тем не менее дороговизна импортных микрофлюидных устройств (ZyMöt[™], США), их отсутствие на фармацевтическом рынке России ограничивает использование данного спо-

соба отечественными специалистами для вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) в коневодстве. Сейчас самой доступной и экономически выгодной процедурой отбора сперматозоидов для ИКСИ и ЭКО является метод всплытия и центрифугирование в градиенте плотности.

Наиболее часто используемая среда в протоколах отбора клеток по методике всплытия – коммерческая безбелковая питательная среда G-MOPS™ (Vitrolife, Швеция), которая позволяет проводить процедуру всплытия вне CO₂-инкубатора и не сдвигает pH.

Цель работы – установить оптимальные методы подготовки сперматозоидов к ИКСИ и ЭКО по показателю подвижности образцов свежеразбавленной и заморожено-оттаянной спермы до и после обработки ее всплытием Direct Swim-Up (DSU), центрифугированием в градиенте плотности (DGC) и центрифугированием в градиенте плотности с последующим всплытием (DGC-DSU).

Материалы и методы. Опыты проводили на образцах свежеразбавленной (n=16) и замороженной спермы (n=12) от 11 жеребцов с проверенной фертильностью, принадлежащих ФГБНУ ВНИИ коневодства имени академика В.В. Калашникова и частным коневладельцам. Сразу после взятия сперму разбавляли 1:3 или 1:2 в отечественной среде ЛХЦЖ (технология ВНИИК) или среде INRA 96 (IMV, Франция) до концентрации не менее 80 млн кл/мл. Эякуляты с концентрацией менее 240 млн кл/мл разбавляли средой «Глюкоза-ЭДТА» в пропорции 1:1 и центрифугировали. Осадок ресуспендировали до концентрации не менее 80 млн кл/мл в ЛХЦЖ или в INRA 96. Концентрация сперматозоидов в пробах заморожено-оттаянной спермы составляла 150 – 350 млн кл/мл.

Для проведения процедуры Direct Swim-Up (DSU) в центрифужную пробирку на 5 мл набирали 1 мл среды G-MOPS™ (Vitrolife, Швеция), на дно помещали 200 мкл разбавленной спермы и ставили в вертикальное положение на 20 минут при температуре 38 °С. Отбирали 750 мкл надосадочной жидкости и центрифугировали 5 мин при 300 g. Затем осадок ресуспендировали в 20 – 60 мкл раствора FERT-TALP с PHE, самостоятельно приготовленного по методике K. Hinrichs [3].

В случае центрифугирования в градиенте плотности в центрифужную пробирку (5 мл) настилали 1,5 мл 45%-ного раствора градиента, на него – 1,5 мл 90%-ного раствора градиента. Градиенты (45 % и 90 %) готовили из растворов SpermGrad™ (100 %) и SpermRinse (Vitrolife, Швеция). Сперму (200 мкл) помещали на градиент и центрифугировали 10 – 20 минут при 200 g. При использовании метода DGC осадок после центрифугирования в градиенте плотности ресуспендировали в среде G-MOPS™, центрифугировали 5 мин при 300 g, полученный осадок вновь ресуспендировали раствором FERT-TALP с PHE. Для метода DGC-DSU центрифугировали по 2 пробирки по 5 мл с каждой пробой, полученный осадок из двух пробирок ставили на всплытие в среде G-MOPS™, отбирали 750 мкл надосадочной жидкости и вновь 5 минут центрифугировали при 300 g. Общую и прогрессивную подвижность сперматозоидов в образцах оценивали с помощью программного обеспечения АРГУС-CASA (ООО «АРГУССОФТ», Россия).

Статистическую обработку материала проводили, используя программу Statistica 12, различия между группами оценивали с помощью непараметрического критерия Уилкоксона с уровнем значимости $p < 0,05$. Обработанные дан-

ные по группам представлены в виде медианы (Me) и верхнего и нижнего квартилей (LQ-UQ).

Результаты исследований и обсуждение. Анализ общей и прогрессивной подвижности гамет свежеразбавленной спермы показал, что достоверные различия между показателями до и после подготовки были только при использовании методов DGC или DGC-DSU (табл. 1). Они позволили не только очистить исходный материал, но и увеличить количество прогрессивно подвижных сперматозоидов в среднем в 1,5

раза (до 70 %). После процедуры DSU в G-MOPS™ показатели подвижности не увеличивались.

Следует уточнить, что методом DSU извлекается только 5 – 10 % сперматозоидов, первоначально подвергнутых всплытию [1]. Следовательно, DSU подходит для высококонцентрированных образцов спермы или для процедуры ИКСИ, которая не требует значительного количества гамет в конечной отобранной фракции [5].

В случае использования заморожено-оттаянной спермы достоверную раз-

Таблица 1

Подвижность сперматозоидов до и после приготовления образцов свежеразбавленной спермы

Исходное качество и методы подготовки	n	Подвижность			
		общая		прогрессивная	
		Me	LQ-UQ	M	LQ-UQ
Исходное качество	16	73 ¹	64,6 – 84,8	45,3 ²	31,6 – 55,3
Всплытие (DSU) в G-MOPS™	16	66,6 ³	60,4 – 77,8	41,5 ⁵	38,1 – 49,2
Центрифугирование в градиенте плотности (DGC)	16	90,1 ⁵	86,4 – 94,7	70,2 ⁶	51,4 – 80,5
Центрифугирование в градиенте плотности с последующим всплытием (DGC-DSU)	16	91,7 ⁷	77,2 – 94,6	69,7 ⁸	55,7 – 84,7

Примечание. $p^{1,2}=0,001$; $p^{1,7}=0,0005$; $p^{2,6}=0,0008$; $p^{4,8}=0,0003$; $p^{3,5}=0,001$; $p^{4,6}=0,001$

Таблица 2

Подвижность сперматозоидов до и после приготовления образцов заморожено-оттаянной спермы

Исходное качество и методы подготовки	n	Подвижность			
		общая		прогрессивная	
		Me	LQ-UQ	M	LQ-UQ
Исходное качество	12	29,4 ¹	20,7 – 41,7	20,1 ²	16,2 – 29,7
Всплытие (DSU) в G-MOPS™	12	46,4 ³	25,2 – 59,5	33,8 ⁴	17,4 – 42,4
Центрифугирование в градиенте плотности (DGC)	12	64,8 ⁵	59,0 – 80,2	54,4 ⁶	48,5 – 60,2
Центрифугирование в градиенте плотности с последующим всплытием (DGC-DSU)	12	68,3 ⁷	65,6 – 78,0	50,9 ⁸	45,2 – 57,8

Примечание. $p^{1,2}=0,003$; $p^{2,4}=0,006$; $p^{1,5}=0,002$; $p^{2,6}=0,002$; $p^{1,7,2,8}=0,002$; $p^{3,5}=0,002$; $p^{4,6}=0,003$

ницу в качестве ее образцов до и после подготовки наблюдали не только при использовании методов DGC или DGC-DSU, но и метода DSU в среде G-MOPS™ (табл. 2). Так, методика подготовки DGC-DSU увеличила прогрессивную подвижность сперматозоидов в 2,5 раза (на 51 %), DGC – в 2,7 раза (на 54 %), а DSU в среде G-MOPS™ – только в 1,7 раза (на 34 %).

Центрифугирование в градиенте плотности дало большее количество подвижных сперматозоидов, чем метод всплытия. Он подходит для сперматозоидов с неоптимальными параметрами качества спермы (низкая концентрация и подвижность). При этом надо учитывать возможность увеличения повреждений ДНК у сперматозоидов в результате центрифугирования [9].

Итак, для подготовки спермы к ИКСИ, когда не требуется большого количества прогрессивно подвижных сперматозоидов, метод всплытия (DSU) может быть применен как для образца свежеразбавленной так и заморожено-оттаянной спермы. Несмотря на достоверное увеличение общей и прогрессивной подвижности сперматозоидов в образце заморожено-оттаянной спермы в случае метода DSU, полученный показатель (33,8 %) не достаточен для применения в процедуре ЭКО. С заморожено-оттаянным материалом это возможно только при использовании методов DGC или DGC-DSU.

Заключение. Наилучшие результаты по увеличению общей и прогрессивной подвижности сперматозоидов достигли с помощью методов DGC или DGC-DSU. Для выбора наиболее оптимального из них требуются дальнейшие исследования, включающие не только анализ подвижности сперматозоидов, но и их морфологии, жизне-

способности, параметров целостности ДНК.

Исследования проводили при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-16-00226).

ЛИТЕРАТУРА

1. Damen S. Semen preparation for equine ICSI- a comparison of commonly used processing methods. Research Report as part of the Master's Dissertation. 2017. Ghent university faculty of veterinary medicine, P.16.
2. De Vos A. et al. Percoll gradient centrifugation can be omitted in sperm preparation for intracytoplasmic sperm injection. J. Hum. Reprod. 1997; 12:1980 – 1984.
3. Felix M.R. et al. Successful in vitro fertilization in the horse: production of blastocysts and birth of foals after prolonged sperm incubation for capacitation. J. Biology of Reproduction. 2022; 107(6):1551 – 1564. <https://doi.org/10.1093/biolre/iocac172>.
4. Gonzalez-Castro R.A., Carnevale E.M. Use of microfluidics to sort stallion sperm for intracytoplasmic sperm injection. J. Anim. Reprod. Sci. 2019; 202:1 – 9.
5. Henkel R.R.; Schill W.-B. Sperm Preparation for ART. Reprod. Biol. Endocrinol. 2003; 1:108.
6. Lorenzen E. et al. Effect of microfluidic sperm sorting on equine ICSI blastocyst rate. J. of Equine Veterinary Science. 2020; 89:103032. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103032>
7. Martin-Pelaez S. et al. IVF with Frozen-Thawed Sperm after Prolonged Capacitation Yields Comparable Results to ICSI in Horses: A Morphokinetics Study. Theriogenology. 2025; 233:39 – 45. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.10.032>
8. Morris L.H., Maclellan L.J. Update on advanced semen-processing technologies and their application for in vitro embryo production in horses. J.Reprod. Fert. Dev. 2019; 31(12):1771 – 1777. DOI:10.1071/RD19301
9. Muratori M. et al. Sperm selection with density gradient centrifugation and swim up: Effect on DNA fragmentation in viable spermatozoa. J. Sci. Rep. 2019; 9:7492.
10. Orsolini M.F., Meyers S.A., Dini P. An Update on Semen Physiology, Technologies, and Selection Techniques for the Advancement of In Vitro Equine Embryo Production: Section II. J. Animals (Basel). 2021; 20(11):3319. DOI: 10.3390/ani11113319
11. Volpes A., Sammartano F., Rizzari S., Gullo S. et al. The pellet swim-up is the best technique for sperm preparation during in vitro fertilization procedures. J. Assist Reprod. Genet. 2016; 33(6):765 – 770. DOI:10.1007/s10815-016-0696-2
12. Yamanaka M., Tomita K., Hashimoto S., Matsumoto H. et al. Combination of density gradient centrifugation and swim-up methods effectively decreases morphologically abnormal sperms. J. Reprod. Dev. 2016; 62:599 – 606.

NOVAMUNE[®]



СТОП

ЦИКЛ БОЛЕЗНИ ГАМБОРО

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



ПЕРЕД ПРИМЕНЕНИЕМ ОЗНАКОМЬТЕСЬ С ИНСТРУКЦИЕЙ

ПРОБИОТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ЛАКТОБАЦИЛЛ

Екатерина Дмитриевна Мандрыка, микробиолог, mandryka.ekaterina@yandex.ru,
ORCID:0009-0004-6941-9499

Павел Николаевич Шастин, к.в.н., старший научный сотрудник, shastin.pasha@yandex.ru,
ORCID:0000-0001-7360-927X

Алексей Иванович Лаишевцев, к.б.н., ведущий научный сотрудник,
и.о. заведующего лабораторией, a.laishevtsev@gmail.com, ORCID:0000-0002-5050-2274

Татьяна Валерьевна Степанова, старший научный сотрудник, admin@viev.ru
ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН» (г. Москва, Россия)

Изучен пробиотический потенциал ряда перспективных штаммов лактобактерий. Оценивали антагонистическую активность по величине зон задержки роста тест-штаммов, уровень кислотообразования (в градусах Тернера) и адгезивную активность с использованием 1%-ной суспензии эритроцитов. Установили, что у исследуемых штаммов лактобацилл *Lactobacillus helveticus* B-1039, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* B-1042 и *Lactobacillus fermentum* B-1038 уровень кислотообразования составил соответственно 180,25 °Т; 190,55 и 211,15 °Т. Показатели адгезии лактобактерий равнялись для *L. helveticus* B-1039 – 2,1; *L. fermentum* B-1038 – 2,72 и для *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* B-1042 – 1,84. Изученные штаммы лактобактерий, по мнению авторов, имеют высокий пробиотический потенциал и перспективны при разработке многокомпонентного лекарственного препарата для животных. **Ключевые слова:** пробиотики, лактобациллы, биобезопасность, антибиотикорезистентность, адгезия, антагонизм.

Probiotic potential of lactobacilli

E.D. Mandryka, Microbiologist

P.N. Shastin, PhD in Veterinary Science, Senior researcher, shastin.pasha@yandex.ru

A.I. Laishevtsev, PhD in Biology, Leading researcher, Acting Head of the laboratory

T.V. Stepanova, Senior researcher

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

The paper presents the results of studying the probiotic potential of a number of promising strains of lactobacilli. Antagonistic activity was determined by the delayed antagonism method using test strains and evaluated based on the results of determining growth retardation zones. The level of acid formation was determined in two repetitions in Turner degrees. Adhesive activity was determined using a 1% suspension of erythrocytes. The level of acid formation in the studied lactobacillus strains was: *Lactobacillus helveticus* B-1039 – 180,25 °T, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* B-1042 – 190,55 °T, *Lactobacillus fermentum* B-1038 – 211,15 °T. The adhesion indices of lactobacilli showed the following values: *L. helveticus* B-1039 – 2,1; *L. fermentum* B-1038 – 2,72, *L. delbrueckii subsp. the bulgaricus* B-1042 index is 1,84. The studied *Lactobacillus* strains have a high probiotic potential, which means that these strains are promising in the development of a multicomponent drug for animals. **Key words:** probiotics, lactobacilli, biosafety, antibiotic resistance, adhesion, antagonism.

DOI:10.30896/0042-4846.2026.29.01.37-40

Пробиотические препараты содержат живые микроорганизмы, способные заселять кишечник бактериями пробионтами, которые осуществляют специфический щадящий контроль над численностью условно-патогенной микрофлоры. Пробионты вытесняют их из состава кишечной популяции, сдерживают развитие факторов патогенности при помощи бактериоцинов, оказывают

стимулирующее действие на иммунную систему [1, 2]. При выборе пробиотиков важно учитывать ряд характеристик, которые делают некоторые штаммы более эффективными для поддержания здоровья и профилактики заболеваний. Эти штаммы должны обладать способностью подавлять рост патогенных микроорганизмов в результате соревнования за питательные вещества,

синтеза антимикробных веществ (таких как бактериоцины) и угнетения роста болезнетворных бактерий из-за изменения pH среды. Чем больше антагонистическая активность у пробиотика, тем эффективнее он защищает кишечник от инфекций.

Лактобациллы должны прочно прикрепляться к стенкам кишечника и эффективно его колонизировать, а не вымываться с кормом или водой, то есть высокие адгезивные свойства позволяют пробиотикам создавать устойчивую микрофлору, способную защищать организм от патогенов и улучшать пищеварение. Молочная кислота, которую вырабатывают лактобациллы, создает более кислую среду в кишечнике, что препятствует росту патогенной флоры и улучшает усвоение некоторых питательных веществ. Помимо этого, кислая среда положительно влияет на работу кишечных ферментов и активизирует моторную функцию кишечника [3, 4, 7 – 12, 15]. Способность к кислотообразованию играет важную роль для желудочно-кишечного тракта организма хозяина, так как за счет молочной и уксусной кислот pH среды в нем смещается в кислую сторону, а многие патогенные микроорганизмы не способны выживать в таких условиях. Данный феномен является частью антагонизма [13, 14].

Цель данного исследования – оценить антагонистическую активность некоторых штаммов лактобацилл, уровень адгезии и кислотообразования.

Материалы и методы. Исследования выполнили в 2024 – 2025 гг., используя штаммы из коллекции ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН: *Lactobacillus fermentum* B-1038, *Lactobacillus helveticus* B-1039 и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* B-1042. Антагонистическую активность определяли методом отсроченного ан-

тагонизма с применением тест-штаммов [5] из Всероссийской коллекции патогенных и вакцинных штаммов ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Shigella Sonnei* I фазы 941, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* K1 5054, *Proteus vulgaris* 401, *Proteus mirabilis* 56/10, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Salmonella infantis* 2495, *Streptococcus pneumoniae* 1997, *Neisseria subflava* 1996, *Candida albicans* 140, *Clostridium difficile* 900. Антагонистическую активность считали низкой, если зона задержки роста составляла 10 – 15 мм, средней – 16 – 20 мм и высокой – более 20 мм.

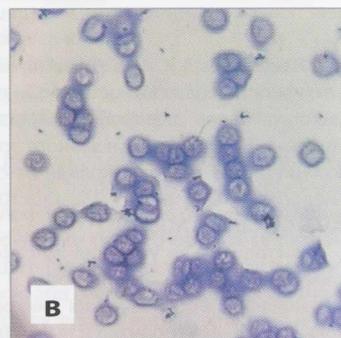
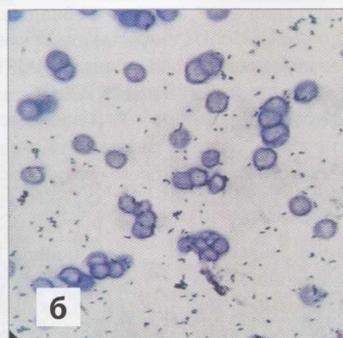
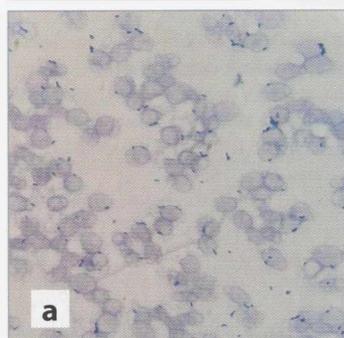
Кислотообразование определяли согласно МУК 4.2.2602–10. Из двух проб высчитывали среднее значение, выраженное в градусах Тернера.

Адгезивную способность изучали с помощью 1%-ной эритроцитарной взвеси человеческой крови первой группы и положительного резуса. Исследуемые культуры вместе с эритроцитами культивировали 30 минут на шуттель-аппарате, затем отмывали. Результаты оценивали с помощью светового микроскопа, подсчитывая число клеток, прикрепившихся к эритроцитам. После этого рассчитывали средний показатель адгезии (СПА) – количество бактериальных клеток/50 эритроцитов. При значении от 0 до 1,0 микроорганизм считали неадгезивным; от 1,01 до 2,00 – низкоадгезивным; от 2,01 до 4,00 – среднеадгезивным; от 4,01 и более – высокоадгезивным [10].

Результаты исследований. По диаметру зоны задержки роста тестовой культуры судили об антагонистической активности изучаемых штаммов лактобацилл. Положительным результатом считали диаметр не менее 20 мм (см. таблицу).

**Антагонистическая активность испытываемых штаммов лактобацилл
по отношению к тест-штаммам**

Наименование штаммов	Зоны подавления роста тест-культур, мм												
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>Sh. Sonnei</i> фазы 941	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Proteus vulgaris</i> 401	<i>Proteus mirabilis</i> 56/10	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Salmonella infantis</i> 2495	<i>Streptococcus pneumoniae</i> 1997	<i>Klebsiella pneumoniae</i> K1 5054	<i>Neisseria subflava</i> 1996	<i>Candida albicans</i> 140	<i>Clostridium difficile</i> 900
<i>Lactobacillus fermentum</i> B-1038	45	35	30	30	35	35	12	48	42	50	50	10	-
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> B-1042	45	>60	42	13	30	18	16	30	25	16	25	30	-
<i>Lactobacillus helveticus</i> B-1039	22	30	40	-	18	24	15	44	45	32	24	25	-



Адгезия клеток *Lactobacillus* к эритроцитам: а – *L. helveticus* B-1039; б – *L. fermentum* B-1038; в – *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* B-1042 (световая микроскопия, окраска по Граму)

Методом отсроченного антагонизма в отношении тест-культур патогенных и условно-патогенных микроорганизмов различных групп показано, что исследуемые штаммы обладают широким спектром антагонистической активности по отношению к патогенам. По рассматриваемым тест-штаммам наибольшую активность проявил *Lactobacillus fermentum* B-1038, затем в порядке убывания *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* B-1042 и *Lactobacillus helveticus* B-1039.

Уровень кислотообразования также был наибольшим у *L. fermentum* B-1038 и составил 211,15 °Т. У *L. helveticus* B-1039 этот показатель равнялся

180,25 °Т, а у *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* B-1042 – 190,55 °Т.

При исследовании адгезивной активности лактобацилл получили следующие значения СПА: для *L. helveticus* B-1039 составил 2,1; для *L. fermentum* B-1038 – 2,72, что говорит об их средней адгезивной способности. У штамма *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* B-1042 СПА было равно 1,84, что указывает на низкую его адгезивную способность. Микрофотографии мазков представлены на рисунке.

Закключение. Изученные штаммы лактобацилл обладают высоким уровнем пробиотического потенциала, что дает

возможность использовать их в составе потенциального пробиотического препарата в будущем.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки и высшего образования Российской Федерации FGUG-2025-0003.

ЛИТЕРАТУРА

1. Артюхова С.И., Антонюк Ю.О. Влияние *Lactobacillus plantarum* на желудочно-кишечный тракт человека и использование их при производстве биопродукта для геродиетического питания. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. Электрон. журн. 2014; 8(1).

2. Дармов И.В. и др. Выделение и сравнительная характеристика штаммов лактобацилл – представителей нормальной кишечной микрофлоры поросят. Журнал Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2015; 2(26):3 – 8.

3. Ермоленко Е.И., Рыбальченко О.В. Антимикробное действие лактобацилл. Журнал медицина 21 века. 2007; 6:41 – 48.

4. Лаишевцев А.И. и др. Доклиническое изучение эффективности и безопасности пробиотических штаммов *Lactobacillus spp.* для профилактики инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта, в том числе ассоциированных с постковидным синдромом. Бактериология. 2023. 8(3):7 – 15. DOI:10.20953/2500-1027-2023-3-7-15. EDN NGEZDJ.

5. Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов. Методические указания МУ 2.3.2.2789–10; 105.

6. Пасивкина М.А. и др. Изучение комбинации пробиотиков и бактериофагов в рамках борьбы с антибиотикорезистентностью. Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы: Сборник трудов XVI Ежегодного Всероссийского

конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского. Москва. 2024; 153. EDN UIBGHNK.

7. Петраков Е.С., Петракова Н.С. Биологические свойства лактобацилл кишечной микрофлоры и их значение в нормализации физиологических функций у сельскохозяйственных животных. Проблемы биологии продуктивных животных. 2014; 2:5 – 31.

8. Позолотина Н.В. и др. Влияние адгезивной активности бактерий *Lactobacillus paracasei* b-11821 на эффективность биопрепарата, предназначенного для использования в свиноводстве. Книга ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. 2018; 1(160):1 – 3.

9. Савицкая И.С. Принципы отбора штаммов для нового лактосодержащего пробиотика. Казанский вестник. КазНУ им. аль-Фараби. 2012; 4(56):228, 229.

10. Система пререгистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков. Методические указания МУК 4.2.2602–10.

11. Соловьева И.В. и др. Биологические свойства лактобацилл. Перспективы использования в лабораториях Роспотребнадзора экспресс- методов амплификации нуклеиновых кислот при контроле качества пищевых продуктов, БАД к пище, лекарственных форм, содержащих лактобациллы. Журнал медицина. 2014; 2:30 – 32.

12. Точилина А.Г. и др. Изучение биологических свойств штаммов рода *Lactobacillus*. Современные проблемы науки и образования. 2015; 5.

13. Хавкин А.И. Микробиоценоз кишечника и иммунитет. Русский медицинский журнал. 2003; 3:122.

14. Червинец В.М. и др. Сравнительная характеристика лактобацилл, выделенных из фекалий здоровых людей, проживающих в Российской Федерации и Казахстане. Журнал Современные проблемы науки и образования. 2016; 6.

15. Ivannikova R. et al. Prospects for the use of probiotics in pig breeding. IV International Conference on Ensuring Sustainable Development in the Context of Agriculture, Energy, Ecology and Earth Science (ESDCA2024): E3S Web of Conferences, Smolensk. 2024; 510: LES ULIS: EDP Sciences 1033.

ПОЧТА РОССИИ

Выбирай, что читать

Подписка на более 6000 газет и журналов



на сайте
podpiska.pochta.ru



в мобильном
приложении



в любом
отделении Почты



у почтальона



ХЕМОСТАТНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ R-ШТАММА БРУЦЕЛЛ

Гульнара Минирашитовна Сафина, к.в.н., ведущий научный сотрудник
Максим Аркадьевич Косарев, к.б.н., ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией
Рамиль Юнусович Насибуллин, научный сотрудник
 ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»
 (г. Казань, Россия)

Разработка и внедрение новых эффективных технологий производства противобруцеллёзных вакцин и диагностических средств – актуальная задача современной науки. Глубинное культивирование микроорганизмов обеспечивает высокое качество роста микробов при снижении затрат на производство. Следовательно, особое внимание уделяют изучению возможностей использования этого способа для производства культуральной массы бруцелл R-штамма. В статье представлены результаты определения оптимальных параметров культивирования, обеспечивающих получение высококачественного биоматериала. Показана перспективность применения периодического и хеMOSTАТНОГО способа выращивания R-штамма для промышленного производства противобруцеллёзных вакцин и диагностических средств. **Ключевые слова:** бруцелла, штамм, R-культура, хеMOSTАТНОЕ культивирование, аэрация среды.

Chemostatic cultivation of the R-strain of brucella

G.M. Safina, PhD in Veterinary Sciences, Leading researcher
M.A. Kosarev, PhD in Biology, Leading researcher, Head of laboratory
R.Yu. Nasibullin, Researcher
 Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety (Kazan, Russia)

The development and implementation of new, more efficient technologies for the production of anti-brucellosis vaccines and diagnostic tools is an urgent task. Deep cultivation of microorganisms ensures high-quality growth of microbes and helps to reduce production costs. Therefore, special attention is being paid to studying the possibilities of deep cultivation for the production of the R-strain brucella culture mass. The goal of these studies is to develop optimal cultivation parameters that will ensure the production of high-quality biomaterial for the subsequent production of vaccines and diagnostic tools. The conducted research has shown the potential of using periodic and chemostat cultivation of the R strain for the industrial production of anti-brucellosis vaccines and diagnostic tools. **Key words:** brucella, strain, R-culture, chemostatic cultivation, aeration of the medium.

DOI:10.30896/0042-4846.2026.29.01.41-45

Биологическая индустрия разрабатывает и выпускает широкий спектр диагностических и вакцинных препаратов для борьбы с различными инфекционными заболеваниями [8, 9]. Среди множества методик производства биопрепаратов особо выделяют технологию глубинного культивирования микроорганизмов, которая демонстрирует значительные преимущества в плане автоматизации и оптимизации производственных процессов. Это обеспечивает высокое качество культур и способствует снижению затрат на их производство, делая вакцины и другие биологические препараты более доступными [1, 6, 7].

В настоящее время используют глубинное периодическое культивирование в биореакторах. Дальнейшее развитие данной технологии направлено на переход от традиционного метода к более современному хеMOSTАТНОМУ (непрерывному) способу. Такой подход позволяет получать монокультуры бактерий с унифицированными и стабильными биологическими характеристиками, что критически важно для создания стандартизированной и эффективной культуральной массы.

Бруцеллёз – одна из опасных зоонозных инфекций, распространение которой может привести к серьезным эконо-

мическим потерям в сельском хозяйстве и представлять угрозу для здоровья человека [3]. Следовательно, разработка и внедрение новых, более эффективных технологий производства противобруцеллёзных вакцин и диагностических средств является актуальной задачей.

В рамках научных исследований особое внимание уделяют изучению возможностей глубинного культивирования для производства культуральной массы бруцелл R-штамма. Необходимо определить оптимальные параметры, обеспечивающие получение высококачественного биоматериала. Такой подход существенно повысит эффективность ветеринарных препаратов, сделает их доступнее и улучшит эпизоотическое благополучие в хозяйствах. Глубинное культивирование позволит эффективно использовать экономичные жидкие среды для выращивания, обеспечит высокий уровень автоматизации процессов и снизит себестоимость продукции за счет промышленного изготовления бактериальной массы [4, 5]. В отличие от других микроорганизмов в производстве культуральной массы R-штамма бруцелл

этот метод не используют из-за высокой требовательности микроорганизмов к условиям и питательным средам. Предпочтение отдают трудоемкому методу поверхностного культивирования на дорогостоящих твердых мясных и печёночных средах [2]. В связи с этим поиск более эффективных способов получения массы бруцелл для создания вакцин и диагностических средств относится к числу приоритетных задач.

Цель данных исследований – изучить влияние скорости разбавления питательных сред на характер роста штамма R-культур бруцелл при хемостатном культивировании.

Материалы и методы. Провели четыре серии экспериментов, которые отличались между собой аэрацией среды и степенью разбавления культуральной жидкости при выходе на хемостат (см. таблицу). Производительность хемостата определяли по формуле

$$R = \frac{f}{v} * X,$$

где R – производительность хемостата на единицу объема питательной сре-

Условия культивирования бруцелл

Показатель	Эксперимент			
	первый	второй	третий	четвертый
рН периодического культивирования	6,9 – 7,25	6,6 – 7,0	6,9 – 7,25	7,0 – 7,2
рН хемостата	7,0 – 7,2	7,25	7,15 – 7,4	7,2
Расход воздуха, л/мин	8,3	5,6	8,6	1,1 – 8,6 (70 % насыщения)
Число оборотов мешалки, об/мин	600	600	630	600
Температура среды, °С	37	37	37	37
Скорость разбавления среды, мл/час ¹	0,1	0,055	0,08	0,12
Время периодического культивирования, ч	37	26	23	40
Время хемостата, ч	8	8	23	7

ды (млрд микробных клеток/мл в час); X – концентрация микробов (млрд клеток); v – объем культуральной жидкости; f – скорость подачи среды (мл/час).

В процессе периодического и хеостатного культивирования бруцелл для корректировки pH и буферной емкости среды использовали растворы соляной кислоты в концентрации от 0,1 до 1 н и глюкозы. Влияние скорости разбавления среды на рост микроорганизмов учитывали по результатам первых трех экспериментов. Материалы четвертого использовали для изучения свойств выращенных культур. Общую скорость роста бруцелл рассчитывали по формуле

$$V = \frac{dx}{dt},$$

где V – общая скорость роста; dx – прирост биомассы; dt – единица времени.

При анализе общей скорости роста учитывали лимитирующий фактор – концентрацию микробных клеток, установленную во время периодического культивирования.

Результаты исследований. В конце периодического культивирования концентрация бруцелл перед выходом на хеостат в первом, втором, третьем и четвертом экспериментах составляла соответственно 28,5; 22,0; 29,5 и 27,0 млрд м.к. в 1 мл. На рисунке 1 графически представлено изменение общей скорости роста микроорганизмов в разные периоды культивирования. В первые 12 ч этот показатель находился в пределах 0 – 0,4 млрд/мл в час, что соответствовало лаг-фазе роста (от a до b). Далее наступал период интенсивного накопления бактериальной массы (от b до c) при концентрации микроорганизмов 22 – 29 млрд/мл. Выявили наибольшую скорость роста – 1,9 млрд/мл в час, которая оставалась неизменной до накопления количества бруцелл в среде в среднем 27 млрд/мл. Далее отмечали резкий спад скорости размножения – фаза замедленного роста и стационарная фаза (от c до d). Перпендикуляры к оси абсцисс показывают максимальное размножение бруцелл в фазу экспоненциального роста.

Установили, что «критическая концентрация» бруцелл находится в пределах 23 – 29 млрд м.к./мл. Замедление скорости роста, вызванное увеличением «тесноты» культуры, связано с наличием корреляции между накоплением бактериальной массы и продуктов метаболизма. Таким образом, переход от периодического культивирования на хеостат целесообразен при концентрации микробных клеток 29 – 30 млрд м.к./мл.

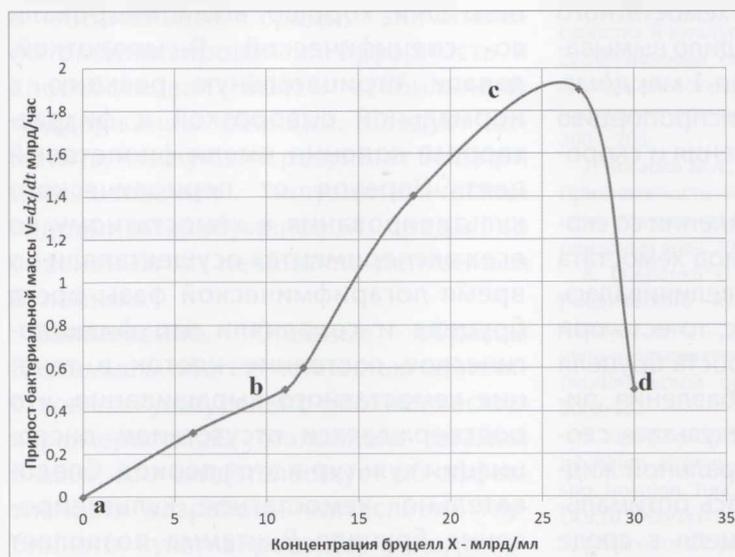


Рис. 1. Скорость роста бруцелл в периодический период культивирования: $a - b$ – лаг-фаза; $b - c$ – экспоненциальное размножение; $c - d$ – замедление роста

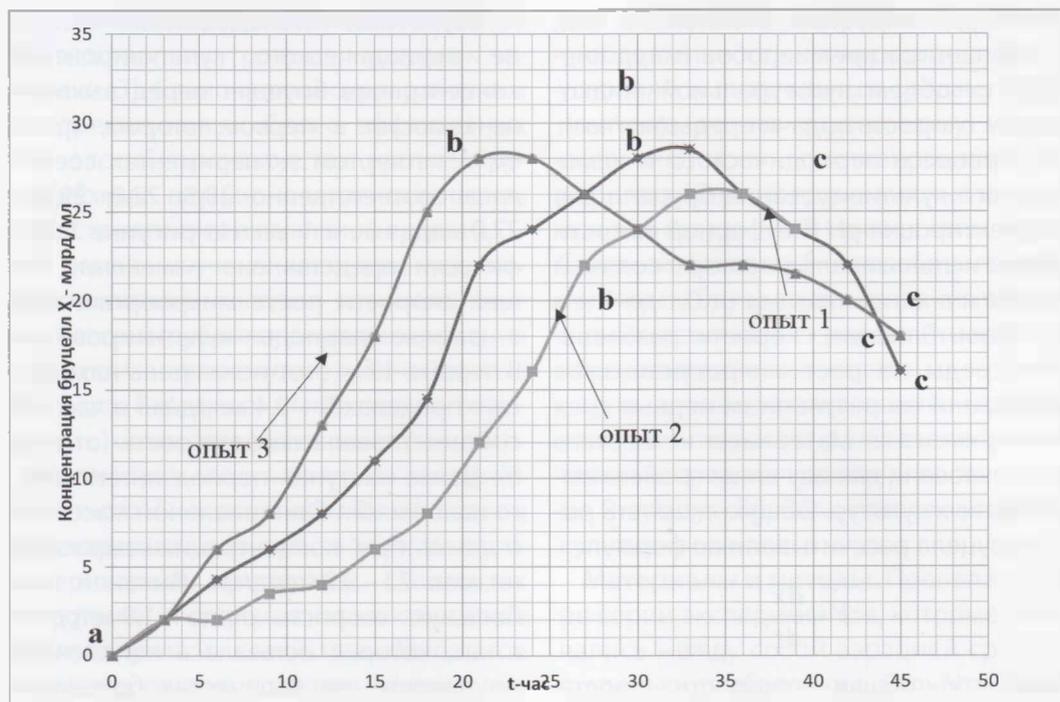


Рис. 2. Влияние скорости разбавления питательной среды на накопление бактериальной массы

Анализируя результаты, полученные при изучении зависимости накопления бактериальной массы от скорости разбавления питательной среды (рис. 2), установили, что при скорости $0,1 \text{ мл/час}^1$ в процессе хеостатного культивирования происходило вымывание культуры в среднем по 1 млрд/час . То есть, создали явную диспропорцию между скоростью разбавления и скоростью роста микробов.

В то же время при разбавлении со скоростью $0,05 \text{ мл/час}^1$ в период хеостата концентрация бруцелл увеличивалась в среднем на $0,5 \text{ млрд/час}$, то есть при таких условиях скорость роста бруцелл опережала быстроту разбавления питательной жидкости. В результате скорость разбавления культуральной жидкости $0,08 \text{ мл/час}^1$ оказалась оптимальной и концентрация бруцелл в среде достигла стационарного состояния, что полностью соответствует принципам работы хеостата.

Культуры бруцелл R-штамма, выращенные периодическим или хеостатным методом, существенно не отличались по морфологическим и культуральным свойствам от исходной. Они хорошо агглютинировали со специфической R-сывороткой, давали отрицательную реакцию с нормальной сывороткой и физраствором, колонии имели фиолетовый цвет. Переход от периодического культивирования к хеостатному во всех экспериментах осуществляли во время логарифмической фазы роста бруцелл и сохраняли это физиологическое состояние клеток в течение хеостатного выращивания, что подтверждается отсутствием диссоциации культур в этот период. Следовательно, хеостатное культивирование бруцелл R-штамма позволяет постоянно поддерживать исходные морфологические и культуральные свойства микроорганизмов.

Для оптимизации реакции среды в процессе и того и другого метода культивирования R-штамма бруцелл необходимо корректировать pH содержимого в кислую сторону. С этой целью использовали растворы соляной кислоты разной концентрации (от 0,1 до 1 н) и глюкозы. Установили, что в случае автоматической подачи целесообразно применять высокие концентрации растворов соляной кислоты – 0,5 – 1 н. Слабые растворы из-за большого количества воды разбавляли культуральную жидкость и вызывали дисбаланс в ее химическом составе. Этого не наблюдали при использовании 0,5 – 1 н растворов. Предложенная концентрация соляной кислоты соответствует техническим возможностям ферментёра, поскольку единовременной заправки емкости нейтрализующей жидкостью достаточно для 72 ч культивирования (в зависимости от степени разбавления среды при выходе процесса на хемостат). Раствор глюкозы (до 1 % в расчете на сухой вес), добавленный в питательные среды, значительно стабилизировал их буферность и способствовал более стабильному поддержанию реакции. Следует отметить, что лучший результат был при использовании полусинтетической гидролизатальбуминовой среды по сравнению с печёночно-пептонным бульоном.

Заключение. Опытные образцы R-штамма *B. abortus* полностью соответствовали культурально-биохимическим характеристикам эталонного штамма R-1096, что свидетельствует об эффективности разработанных условий глубинного культивирования и подтверждает потенциал данной технологии для использования при производстве вакцин и диагностикумов, а также в

исследовательских целях. Периодическое и хемостатное культивирование R-штамма повышает производительность и стабильность процесса, что особенно важно при приготовлении биопрепаратов в промышленных масштабах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Егоров Н.С., Олескин А.В., Самуилов В.Д. Биотехнология. М.: Высшая школа. 1987; 159.
2. Девришов Д.А., Шведов В.В., Шведов Д.В., Бедоева З.М. Сравнительная оценка ростовых свойств производственных культур бруцелл на различных питательных средах. Ветеринарная медицина. 2014; 1:19 – 34.
3. Глубинное культивирование микроорганизмов. URL: <http://www.bioinside.ru/conibs-1246-2.html> (дата обращения 16.12.2022).
4. Карпов А.А. Масштабирование процессов глубинного культивирования микроорганизмов в биореакторах. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности РАСХН. Щелково, 2004; 26.
5. Косарев М.А., Насибуллин Р.Ю., Сафина Г.М., Габбасова А.К. Изучение, подбор оптимальных условий глубинного культивирования инагглютиногенного R-штамма *B. abortus*. Инновационные решения актуальных вопросов безопасности. Сборник материалов Международной научно-практической конференции. Казань: ФЦТРБ-ВНИВИ, 2021; 83 – 86.
6. Косарев М.А., Насибуллин Р.Ю., Сафина Г.М., Богова Я.А. Культуральные, агглютиногенные и биохимические свойства R-культуры бруцелл, выращенной глубинно-суспензионным способом. Инновационные решения актуальных вопросов биобезопасности. Международная научно-практическая конференция. Казань, 2022; 200 – 203.
7. Косарев М.А., Насибуллин Р.Ю., Сафина Г.М. и др. Приживаемость и иммуногенность R-культуры бруцелл, полученной глубинным культивированием. Ветеринарный врач. 2024; 1:40 – 45.
8. Озеренко О.А. Моделирование процессов периодического культивирования микроорганизмов. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности РАСХН. Щелково, 2004; 28.
9. Karagül M.S., İkiş S. Comparison of the isolation and inhibition abilities of selective media used for *Brucella* spp. Isolation. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 2017; 41:781 – 786. DOI:10.3906/vet-1701-50
10. Vicente A.F., Antunes J.M.A.P., Lara G.H.B., Mioni M.S.R. et al. Evaluation of three formulations of culture media for isolation of *Brucella* spp. regarding their ability to inhibit the growth of contaminating organisms. Biomed. Res. Int. 2014; 702072. DOI:10.1155/2014/702072

ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ И ЦИТОПАТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТА ИЗ *ANISAKIS SIMPLEX* L3 НА КУЛЬТУРЫ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Ольга Игоревна Лазарева, к.б.н., доцент, ol.manina@yandex.ru

Татьяна Николаевна Сивкова, д.б.н., профессор, доцент, tatiana-sivkova@yandex.ru

Владислав Александрович Иванов, аспирант, Ivovlad997@gmail.com

ФГБОУ ВО «Пермский государственный аграрно-технологический университет имени академика Д.Н. Прянишникова» (г. Пермь, Россия)

Методом сканирующей электронной микроскопии изучили механизм токсического действия экстракта *A. simplex* L3 на культуру инфузории *Paramecium caudatum*, на поверхности которых отмечали деструкцию и повреждение структур клеточных мембран. Экстракт из гельминтов также оказывал цитопатический эффект на фибробласты крыс. В клеточной линии регистрировали дистрофию клеток, нарушение процесса деления, кариопатологию. **Ключевые слова:** личинки анисакид, *Anisakis simplex*, экстракт, эукариоты, токсическое действие, фибробласты крыс, цитопатический эффект.

Cytopatic effect of somatic extract of *Anisakis simplex* L3 on the culture of eukaryotic cells

O. I. Lazareva, PhD in Biology, Associate professor, ol.manina@yandex.ru

T.N. Sivkova, PhD in Biology, professor, tatiana-sivkova@yandex.ru

V.A. Ivanov, Graduate student, Ivovlad997@gmail.com

Perm State Agro-Technological University named after academician D. N. Prianishnikov (Perm, Russia)

The mechanism the toxic action of *A. simplex* L3 extract on the culture of ciliates *Paramecium caudatum* was studied using scanning electron microscopy. The cytopathic effect of the helminth extract on rat fibroblasts. The study of the surface of *P. caudatum* made it possible to establish the destruction and damage of cell membrane structures. In rats' fibroblast cell line, cytopathic effects, cell dystrophy, disruption of the division process, and karyopathology were recorded. **Keywords:** anisakid larvae, *Anisakis simplex*, extract, eukaryotes, toxic effect, rat fibroblasts, cytopathic effect.

DOI:10.30896/0042-4846.2026.29.01.46-51

Anisakis simplex – космополит в морских экосистемах, может представлять угрозу для человека [2, 21, 22], вызывая тяжелые патологии, иногда приводящие к летальному исходу [13]. Личинки анисакид содержат термостабильные белки, оказывающие токсическое действие на лабораторных животных [15] и простейших, эмбриотоксическое – на птиц и млекопитающих [8, 15]. Механизм такого патогенного действия требует дальнейшего изучения, так как он может складываться из нескольких компонентов, включающих как непосредственный цитотоксический эффект, так и опосредованное влияние через иммунный ответ макроорганизма. Одним из универсальных объектов изучения токсичности и цитотоксичности на эукариотических организмах служат простейшие [11], в частности инфузории, так как они сочетают в себе морфоло-

гические признаки как клетки, так и отдельного организма [7, 9]. Высокая чувствительность позволяет использовать их в экологических, пищевых, медицинских и других исследованиях [5, 7, 24]. При воздействии на клетки простейших наблюдают целый комплекс физиологических и биохимических изменений, что позволяет изучать биологические эффекты, возникающие по разным причинам и имеющие различные механизмы действия [24].

Соматические и экскреторно-секреторные продукты личинок *A. simplex* вызывают патологию пищеварительной и/или иммунной системы в виде гиперчувствительности и воспаления [19], при длительном воздействии развивается хронический процесс, сопровождающийся иммуносупрессией, которая благоприятствует развитию онкологии [6, 23, 27]. Результаты изучения воздей-

ствия экстракта из личинок *A. simplex* на клетки *in vitro* противоречивы – на клеточную линию фибробластов Hs-68 экстракт оказывал пролиферативное воздействие [25], на трансформированные клетки млекопитающих лимфоидного (P3/X63-Ag8) и эпителиоидного (HeLa и Caco-2) происхождения – цитостатическое [22, 26], на эпителиоидные (Vero) – антипролиферативное [16]. Поэтому необходимы дополнительные исследования по влиянию экстракта из *A. simplex* L3 на эукариотические клетки [21], что и стало целью нашей работы.

Материалы и методы. Эксперименты провели на кафедре Пермского ГАТУ, электронную микроскопию – в лаборатории Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН (г. Пушино). Неочищенные соматические белковые экстракты из личинок *A. simplex* третьей стадии готовили в стерильном боксе по методу E.J. Rutenberg et al. в модификации авторов [15]. Нежизнеспособных личинок выделяли из замороженных путассу – *Micromesistius poutassou*, ЭИ 99,96 %, ИИ 2 – 108 экз. Идентифицировали неполовозрелых нематод по морфологическим признакам: форме и наличию сверлильного зуба, форме хвоста, наличию длинного желудочка без придатка, расположению экскреторной поры [4, 20, 28, 29]. Личинок (n=500) многократно промывали водопроводной водой, деконтаминировали растворами антибиотиков (пенициллин 2000 ЕД/мл, стрептомицин 1 мг/мл и нистатин 2500 мг/мл), тщательно отмывали стерильным физиологическим раствором, измельчали в асептических условиях и замораживали при минус 18 °С. Гомогенизацию проводили путем многократного замораживания и оттаивания, заливали стерильным забуференным физиологическим раствором (рН 7,2) и экстрагировали белки в течение 18 ч

при 4 °С. Полученный гомогенат центрифугировали 15 мин при 14000 об/мин.

Каждую партию экстракта обязательно контролировали на стерильность микробиологическими методами. Результаты учитывали через 14 – 15 дней культивирования на мясопептонном агаре (МПА) и бульоне (МПБ) при 37±1 °С, на агаре Сабуро – при 23±1 °С. Безвредность устанавливали внутрикожным введением 0,3 мг (по белку) гомогената лабораторным кроликам в область уха. Общий белок в гомогенате определяли с использованием набора реагентов «Белок-ПГК-Ново (вариант 1)» (Вектор-Бест, Россия) на биохимическом анализаторе Awareness Technology StatFax 1904+ (США) колориметрическим методом с пирогаллоловым красным. Готовый продукт хранили при минус 18 °С.

Токсическое действие экстракта исследовали на культуре клеток *P. caudatum*, выращенных на среде Лозина-Лозинского с добавлением дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в качестве источника питания. Чувствительность инфузорий определяли по времени их гибели, которую фиксировали по прекращению движения простейших и признакам распада клеток [18].

При получении материала для электронной микроскопии на парамеций воздействовали экстрактом в течение 15 минут, затем их выделяли из культуральной среды центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3 мин, фиксировали и исследовали по стандартной методике [8].

Вторую часть работы проводили на монослое фибробластов крыс, в который инокулировали 1,0 мл экстракта. Клеточный материал культивировали при 37±1 °С в среде α-MEM с добавлением 1 % сыворотки и 80 мкг/мл гентамицина. Результаты учитывали визуально каждые 12 часов. Через 36 ч регистри-

ровали изменение цвета питательной среды, что служило основанием для прекращения опыта. Фибробласты фиксировали этиловым спиртом, окрашивали по Романовскому-Гимзе и просматривали на микроскопе Meiji (Japan), оценивая состояние клеток и наличие патологий.

Математическую обработку полученных данных выполняли в программе Microsoft Excel.

Результаты исследований и обсуждение. В приготовленных партиях экстракта из *A. simplex* контаминации микроорганизмами не выявили. Количество общего белка в образце для эксперимента на парамециях составило 1,8 мг/мл, с фибробластами – 1,0 мг/мл.

Под воздействием экстракта гибель 50 % (LD_{50}) *P. caudatum* наблюдали че-

рез 8 минут после добавления биоматериала, а 100 % (LD_{100}) – через 18 минут. Микроскопическими исследованиями погибших инфузорий зафиксировали деструктивные изменения наружных мембран на полюсах и целой клетки, дефекты эктоплазмы в виде пор (рис. 1).

Гибель парамеций показала, что исследуемый продукт проявляет цитотоксическую и цитоцидную активность. В литературе практически нет сообщений об использовании протист в качестве тест-объектов при воздействии на них биологических факторов. Исключение – микробные токсины, к некоторым из которых они чувствительны [12]. Еще реже встречаются морфологические описания внешней формы простейших под действием токсических веществ [14]. Результаты экспериментов по воз-

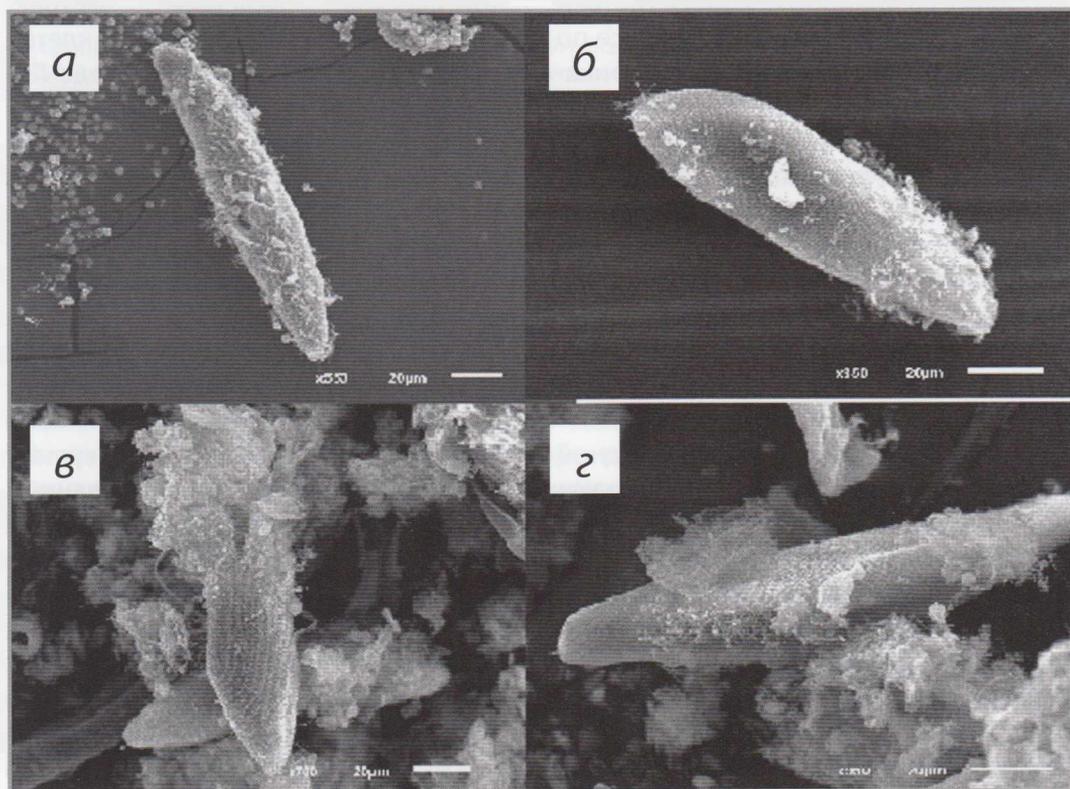


Рис. 1. Инфузории *Paramecium caudatum*: а – контроль (x500); б – воздействие экстракта из *A. simplex*, деструкция на полюсе (x800); в – лизис клетки (x700); г – деструкция оболочки на обоих полюсах клетки (x950)

действию на инфузории химическими веществами позволили предположить несколько типов генетически предопределенных реакций, проявляющихся нарушением осморегуляции и целостности покровов [14]. Пассивная реакция сопровождается кратковременным инцистированием, активная – образованием в пелликуле пульсирующих вакуолей из альвеол, что в обоих случаях предотвращает гибель клетки. Интересно, что при воздействии низкими концентрациями токсикантов клетки погибают, но не лизируются, тогда как при высоких – разрушается их наружная плазматическая мембрана с последующим лизисом тела инфузорий [14].

Сообщают, что деструктивные мембранные патологии у ресничных могут свидетельствовать об интенсификации процессов свободнорадикального окисления [24] и развитии окислительного стресса [10]. Подобные процессы в основном описаны при воздействии различных химических веществ [7] и физических факторов [5] на цилиаты, что позволяет считать их моделью для изучения свободнорадикальной биологии и эффектов токсических веществ [5, 7]. В процессе развития окислительного стресса, при дисфункции биологических мембран [10] возможны повреждения клеточных компонентов, например митохондрий [17]. В данном эксперименте на парамециях мы не исследовали внутриклеточные изменения под воздействием экстракта, однако в других работах они были установлены в митохондриях гемопоэтических клеток и сперматоцитов мышей *in vivo* [8]. Изучение воздействия разного рода повреждающих агентов на клетки, органоиды и другие модели показало, что нарушение мембран в целом обусловлено перекисным окислением липидов, действием мембранных фосфолипаз,

осмотическим растяжением и адсорбцией полиэлектролитов. В совокупности все перечисленные факторы снижают электрическую прочность, что приводит к пробое мембраны из-за разности потенциалов. Исходя из этого, предполагают, что самопробой электрическим полем – универсальный механизм изменения свойств мембран при патологии, приводящий к гибели клетки [3].

Известно, что окислительный стресс посредством различных генетических и эпигенетических механизмов индуцирует канцерогенез [17]. Пока не сделано выводов о роли окислительного стресса в формировании злокачественных новообразований, так как восприимчивость разных типов клеток и тканей к активным формам кислорода, актиоксидантам и индукции опухоли неодинакова [17]. Хотя онкогенные явления не характерны для одноклеточных организмов, В.Н. Манских [9] считает, что низкие концентрации стимулируют рост и размножение клеток, высокие, напротив, вызывают острое токсическое действие [9]. Недавние исследования вновь подтвердили возможность использования простейших *Tetrahymena pyriformis*, как альтернативу животным, для изучения цитотоксичности доксорубина – противоопухолевого антибиотика [11]. Учитывая вышесказанное, полагаем целесообразным использовать инфузории-парамеции для определения действия экстракта на эукариотические организмы.

На примере лекарственных препаратов установлено, что канцерогенное действие напрямую связано с противоопухолевыми цитостатиками. Спустя время, они могут претерпевать метаболические превращения и вызывать генетические и эпигенетические повреждения, способствующие канцерогенезу. Какие из них являются первичными, определить сложно [1].

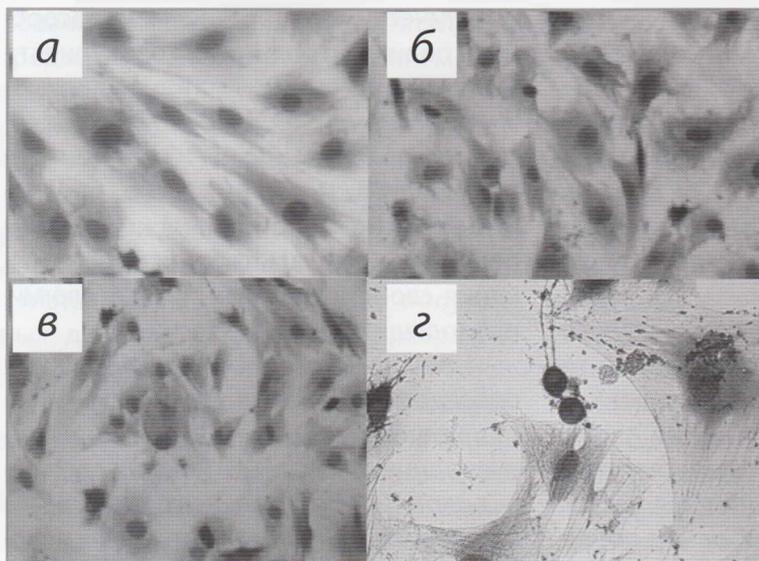


Рис. 2. Фибробласты крысы, окраска по Романовскому-Гимзе, (x400): а – контроль; б – опыт, вакуолизация цитоплазмы; в – опыт, неразделившаяся клетка; г – опыт, двухъядерная клетка

Эксперимент на фибробластах крыс показал, что через 36 ч воздействия экстракта плотность монослоя по сравнению с контролем снижалась (рис. 2). Регистрировали мелкую вакуолизацию в цитоплазме, появлялись разноразмерные клетки. Особенно стоит отметить наличие неразделившихся клеток, двухъядерность, бобовидную форму ядра – все это подтверждает наличие цитопатического эффекта у личинок анизакид.

При воздействии экскреторно-секреторными и неочищенными белками анизакид на культуру фибробластов HS-68 С.М. Messina et al. [25] наблюдали прогрессирующее снижение жизнеспособности в зависимости от дозы по белку. Все использованные концентрации экскреторно-секреторных продуктов проявляли более выраженный эффект через 24 ч, а через 96 ч жизнеспособность клеток, обработанных экскреторно-секреторным экстрактом, составляла 5 %, соматическим – 3 %. Авторы обнаружили, что вытяжка из личинок анизакид стимулирует выработку активных форм

кислорода, повышает уровень белков р53, теплового шока 70 и фактора некроза опухоли, а также активирует экспрессию генов. Реакция клеток на продукты *Anisakis* приводит к повреждению ДНК, что создает условия для клеточной трансформации [25]. N. Carballeda-Sangiao et al. [22] при воздействии разных доз соматического экстракта из *A. simplex* на клеточ-

ную линию Сасо-2 не отмечали снижения жизнеспособности клеток, но регистрировали увеличение уровня активных форм кислорода. Таким образом, наши наблюдения согласуются с ранее описанными результатами, подтверждают наличие в экстрактах из нематод высокотоксичных веществ, вызывающих цитопатические повреждения.

Заключение. Выявили общее цитотоксическое действие соматического экстракта из личинок *A. simplex* на эукариотические клетки разных систематических групп – инфузории *P. caudatum* и культуру фибробластов крыс. Наличие в составе личинок анизакид продуктов, вызывающих патологию на клеточном уровне, необходимо учитывать при разработке терапии гельминтоза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белицкий Г.А., Кирсанов К.И., Лесовая Е.А., Якубовская М.Г. Лекарственный канцерогенез: факторы риска и возможности предотвращения. Успех биологической химии. 2020; 60:173 – 226.
2. Бусарова О.Ю., Паренский В.А. О выживаемости личинок морской паразитической нематоды *Anisakis simplex sensu lato* (Rudolphi, 1809) в пресных водах. Изв. ТИНРО, 2022; 202(4):906 – 916. DOI:10.26428/1606-9919-2022-202-906-916.

3. Владимиров Ю.А. Биологические мембраны и запрограммированная смерть клетки. Соросовский образовательный журнал. 2000; 6(9):2 – 9.
4. Гаевская А.В. Анизакидные нематоды и заболевания, вызываемые ими у животных и человека. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2005; 223 с.
5. Груздев Г.А., Карпухина О.В., Якунин В.Г., Иноземцев А.Н. и др. Влияние низкотемпературной плазмы атмосферного давления на культуру клеток *Paramecium caudatum*. Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2021; 76(4):273 – 277.
6. Иванов В.А. Влияние инвазии личинками анизакид на развитие онкологических процессов. Современные проблемы и прикладной паразитологии. Материалы XV национальной научно-практической конференции памяти профессора В.А. Ромашова. Воронеж. 2021; 115 – 119.
7. Карпухина О.В., Иноземцев А.Н., Гумаргалиева К.З., Поварнина П.Ю., Гудашева Т.А. Цитопротекторные свойства дипептидных миметиков фактора роста нервов и мозгового нейротрофического фактора, ГК-2 и ГСБ-106, в модели окислительного стресса у инфузорий. Фармакокинетика и фармакодинамика. 2018; 4:37 – 41. DOI:10.24411/2587-7836-2018-10028.
8. Лазарева О.И. Цитопатическое действие соматического экстракта личинок *Anisakis simplex* третьего возраста на эукариотические и прокариотические клетки: монография. Пермь. ИПЦ «Прокрость», 2021; 171 с.
9. Манских В.Н. Очерки эволюционной онкологии. Под ред. Перельмутера В.М. Томск: СибГМУ, 2004; 175 с.
10. Мартусевич А.К., Карузин К.А. Окислительный стресс и его роль в формировании дезадаптации и патологии. Биорадикалы и антиоксиданты. 2015; 2:5 – 18.
11. Позднякова А.Н., Черемных Е.Г., Соколов О.Ю., Кост Н.В. и др. Оценка цитотоксичности пептидных модификаций доксорубина на *Tetrahymena pyriformis*. Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2021; 497:199 – 203. DOI:10.31857/S2686738921020220
12. Поляков Е.А., Поляков А.Е., Семенова Т.Ф. Чувствительность парамеций к микробным токсинам. Современные проблемы природопользования, охотоведения и звероводства. 2007; 1:350.
13. Попов А.Ф., Симакова А.И., Петухова С.А. и др. Анизакидоз в Приморском крае. Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2020; 2:15 – 20. DOI:10.33092/0025-8326mp2020.2.15-20
14. Присный А.В., Волынкин Ю.Л., Хампос Н.Н. Механизмы устойчивости инфузорий к химическим повреждениям и их преодоление летальными концентрациями синтетических поверхностно-активных веществ (СПАВ). Региональные геосистемы. 2009; 11(66):4 – 54.
15. Сивкова Т.Н., Бережко В.К. Кариопатическое и патоморфологическое действие продуктов метаболизма личинок анизакид. Пермь. ФГОУ ВПО Пермская ГСХА, 2011; 132 с.
16. Сивкова Т.Н., Сивкова Е.С. Антипролиферативный эффект экстракта *Anisakis simplex* Rudolphi, 1809 (Dujardin, 1845) L3 на клетки линии Vero in vitro. Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. 2020; 21:375 – 378.
17. Ходос М.Я., Казаков Я.Е., Видревич М.Б., Брайни-на Х.З. Окислительный стресс и его роль в патогенезе. Вестник уральской медицинской академической науки. 2017; 14(4):381 – 398. DOI:10.22138/2500-0918-2017-14-4-381-398
18. Черемных Е.Г., Кулешин А.В., Кулешина О.Н. Биотестирование пищевых добавок на инфузориях. Вестник РУДН. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. 2011; 3:5 – 12.
19. Adroher-Auroux F.J., Benitez-Rodríguez R. Anisakiasis and Anisakis: An underdiagnosed emerging disease and its main etiological agents. Res. Vet. Sci. 2020; 132:535 – 545. DOI:10.1016/j.rvsc.2020.08.003
20. Anderson R.C. Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmission. 2nd ed. CABI. Publishing, Wallingford, 2000; 650.
21. Bellini I., Scribano D., Ambrosi C., Chiovoloni C. et al. Anisakis extracellular vesicles elicit immunomodulatory and potentially tumorigenic outcomes on human intestinal organoids. Parasit. Vectors. 2024; 17(1):393. DOI:10.1186/s13071-024-06471-7
22. Carballeda-Sangiao N., Sánchez-Alonso I., Navas A., Arcos S.C. et al. Anisakis simplex products impair intestinal epithelial barrier function and occludin and zonula occludens-1 localisation in differentiated Caco-2 cells. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2020; 14(7):e0008462. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008462>
23. Garcia-Perez J.C., Rodriguez-Perez R., Ballester A., Zuloaga J. et al. Previous Exposure to the Fish Parasite *Anisakis* as a Potential Risk Factor for Gastric or Colon Adenocarcinoma. Medicine (Baltimore). 2015; 94(40):e1699. DOI:10.1097/MD.0000000000001699
24. Karpukhina O.V., Gumargaliev K.Z., Inozemtsev A.N. Effect of antioxidant compounds on oxidative stress in unicellular aquatic organism. J. of Nature Science and Sustainable Technology. 2014; 8(2):112 – 119.
25. Messina C.M., Pizzo F., Santulli A., Bušelić I. et al. Anisakis pegreffii (Nematoda: Anisakidae) products modulate oxidative stress and apoptosis-related biomarkers in human cell lines. Parasit. Vectors. 2016; 9(1):607. DOI:10.1186/s13071-016-1895-5
26. Raybourne R., Deardorff T.L., Bier J.W. Anisakis simplex: larval excretory secretory protein production and cytostatic action in mammalian cell cultures. Exp Parasitol. 1986; 62(1):92 – 97. DOI:10.1016/0014-4894(86)90012-3
27. Rogozin I.B., Pavlov Y.I., Goncarencu A., De S., Lada A.G. et al. Mutational signatures and mutable motifs in cancer genomes. Brief Bioinform. 2018; 19(6):1085 – 1101. DOI:10.1093/bib/bbx049
28. Shih H.H., Ku C.C., Wang C.S. Anisakis simplex (Nematoda: Anisakidae) third-stage larval infections of marine cage cultured cobia, *Rachycentron canadum* L., in Taiwan. Vet. Parasitol. 2010; 171(3 – 4):277 – 285. DOI:10.1016/j.vetpar.2010.03.023.
29. Smith J.W. *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809, det. Krabbe, 1878) (Nematoda: Ascaridoidea): morphology and morphometry of larvae from euphausiids and fish, and a review of the life-history and ecology. J. Helminthology. 1983; 57:205 – 224. DOI:10.1017/S0022149X00009512.

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ LB-АГАР ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ И ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ СПОРОВЫХ КУЛЬТУР *BACILLUS ANTHRACIS*

Леонид Иванович Маринин, к.м.н., ведущий научный сотрудник
Раиса Ивановна Миронова, научный сотрудник
Нина Андреевна Шишкова, к.б.н., ведущий научный сотрудник
Евгений Александрович Тюрин, к.м.н., ведущий научный сотрудник
Александр Николаевич Мокриевич, д.м.н., главный научный сотрудник
Иван Алексеевич Дятлов, д.м.н., профессор, академик РАН

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
 Роспотребнадзора (г.о. Серпухов, п. Оболенск, Россия), info@obolensk.org

На основании анализа литературы и собственных исследований по изучению возбудителя сибирской язвы обобщены сведения о приготовлении и оценке свойств споровых культур *B. anthracis*. В статье описаны некоторые особенности приготовления споровых культур в матрацах на модифицированной агаровой среде по Лурия-Бертани (LB-агар). По отработанной технологии на модифицированной питательной среде Лурия-Бертани приготовлены споровые культуры 225 вирулентных и вакцинных штаммов *B. anthracis*, которые хранятся в «ГКМП-Оболенск». Среда обеспечивает высокий уровень спорообразования *Bacillus anthracis* (1 млрд спор с 1 мл среды), удобна в использовании. Подтверждена возможность длительного сохранения спорами жизнеспособности и основных свойств при хранении в 30 %-ном глицерине. Наблюдения показали, что споровые культуры, приготовленные в 1956 и 1993 гг., сохранили все биологические, генетические, вирулентные и иммуногенные свойства. **Ключевые слова:** *Bacillus anthracis*, штамм, споровая культура, свойства, питательные среды, культивирование, сохраняемость.

The LB-agar modified for prepared and long-term preservation cultures of *Bacillus anthracis*

L.I. Marinin, PhD in Medicine Sciences, Leading researcher
R.I. Mironova, Researcher

N.A. Shishkova, PhD in Biology, Leading researcher

E.A. Tyurin, PhD in Medicine Sciences, Leading researcher

A.N. Mokrievich, PhD in Medicine Sciences, Chief researcher

I.A. Dyatlov, PhD in Medicine Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор
 (Serpukhov, Obolensk, Russia), info@obolensk.org

Based on the analysis of the literature and our own experimental data of a long-term study of the properties of the anthrax pathogen, information on the preparation and evaluation of the properties of *B. anthracis* spore cultures is summarized. The article describes some features of the preparation of spore cultures in mattresses on a modified agar medium according to Luria-Bertani (LB-agar). Spore cultures of 225 virulent and vaccine strains of *B. anthracis* were prepared using the proven technology on the modified Luria-Bertani nutrient medium, which are stored at GCMP-Obolensk. The medium provides a high level of spore formation of *Bacillus anthracis* (1 billion spores per 1 ml of medium) and is easy to use. The possibility of long-term preservation of spores of viability and basic properties when stored in 30 % glycerol has been confirmed. Observations showed that the spore cultures prepared in 1956 and 1993 retained all biological, genetic, virulent and immunogenic properties. **Key words:** *Bacillus anthracis*, strain, spore culture, properties, nutrient media, cultivation, shelf life.

DOI: 10.30896/0042-4846.2026.29.01.52-57

Совершенствование высокоэффективных средств лечения и профилактики сибирской язвы связано с поддержанием культур вакцинных и вирулентных штаммов. Основные требования проведения научно-исследовательских работ предполагают сохранение штаммов в жизнеспособном состоянии с неизменными свойствами. Для этого необхо-

димо усовершенствовать методы приготовления споровых культур и исследовать их по отдельным свойствам или набору признаков.

Споровую культуру *B. anthracis* получают при выращивании на агаровых питательных средах на основе триптического перевара казеина, к которому добавляют водный экстракт дрожжей и

минеральные соли, а также пшеничный агар или агар Хоттингера с аминным азотом 120 мг %. В разных учреждениях используют разные питательные среды. Так, в Ставропольском научно-исследовательском противочумном институте Роспотребнадзора споровые культуры *B. anthracis* готовят на питательной среде Гладстона-Филдса, содержащей аминокислоты, кормовые дрожжи, маннит [2, 3, 6]. В 48 Научно-исследовательском институте Министерства обороны используют среду на основе триптического гидролизата мяса или рыбкопостной муки (по Хоттингеру), содержащем 50 – 60 мг% общего азота, с добавлением 2 % агар-агара при pH 7,1. Мы в своих исследованиях споровые культуры получали при выращивании на модифицированном LB-агаре по Луриа-Бертани, имеющем уменьшенную в два раза концентрацию питательных веществ [5]. Одно из требований к споровым культурам сибиреязвенных штаммов – сохранение ими исходных биологических свойств при длительном хранении. Споровые культуры хранят в сухом или жидком состоянии (в лиофильно высушенном виде или в 30%-ном глицерине). Самое широкое применение нашел способ хранения культур микроорганизмов, особенно вегетативных форм, в лиофильно высушенном состоянии.

Р.А. Салтыков и соавт. (1976) исследовали культуры вакцинного штамма СТИ-1 через 20 и 30 лет хранения. Установили, что основные биологические свойства (культурально-морфологические, безвредность и иммуногенность) их оставались без изменений. Наблюдали лишь замедление прорастания спор в культуре после 30 лет хранения. На морских свинках и кроликах, иммунизированных разными препаратами вакцины СТИ, отмечали их высокую иммунологическую эффективность.

О.И. Коготкова и соавт. [1] показали, что споровые культуры штаммов 81/1 и Ч-7 сохранили все свои свойства, в том числе вирулентность, в течение 14 лет (срок наблюдения) пребывания в лиофильно высушенном состоянии.

Сравнительно часто применяют метод хранения культур *B. anthracis* в виде спор в 30 – 50 %-ном водном растворе глицерина. Этот способ использовал еще Л.С. Ценковский. Сохранение жизнеспособности и иммуногенных свойств водно-глицериновых препаратов со сроком хранения до 27 лет подтверждали и другие исследователи (И.В. Шенцев и соавт., 1981). При этом сохраняемость основных биологических свойств мало зависела от метода культивирования штамма и способа консервирования (водно-глицериновая взвесь или лиофильное высушивание). Следует также привести сведения о сохранности свойств споровыми культурами вакцинных штаммов Ланге, приготовленными в 1897, 1900, 1905, 1918 и 1927 гг. и хранившимися в 30 %-ном растворе глицерина при комнатной температуре [7].

Цель исследований – определение особенностей приготовления споровых культур микроорганизмов на модифицированной (голодной) агаровой среде (LB-агар) и подтверждение возможности длительного сохранения жизнеспособности спор *B. anthracis*.

Материалы и методы. В работе использовали культуры *B. anthracis* вакцинных и вирулентных штаммов из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКМП-Оболенск», приготовленные в 1956 и 1993 гг. Безвредность и иммуногенность культур оценивали на беспородных белых мышках и морских свинках по общепринятым методам [4].

Свойства споровых культур изучали при выращивании на LB-агаре (по Лу-

риа-Бертани) [4]. Для приготовления агаровой среды в 1 дм³ дистиллированной воды размешивали 10,0 г пептона, 5,0 г дрожжевого экстракта, 10,0 г натрия хлорида и 15,0 г агар-агара. Устанавливали конечное значение pH 7,0±0,2. Подогревали до полного растворения частиц. Среду стерилизовали автоклавированием при 1,1 атм. (121 °С) в течение 15 мин и разливали во флаконы. Готовую среду хранили при температуре от 2 °С до 8 °С.

При приготовлении модифицированного (голодного) агара по Луриа-Бертани (для получения спор) добавляли уменьшенное количество ингредиентов: пептона – 5,0 г, дрожжевого экстракта – 2,5 г, натрия хлорида – 5,0 г, агар-агара – 15,0 г. Доводили pH до 6,8 – 7,0. LB-бульон готовили так же, как и LB-агар, но без добавления агар-агара, устанавливали pH 7,2 – 7,4.

Результаты исследований и обсуждение. Агаризованную среду разливали в матрацы (плоские стеклянные сосуды) с таким условием, чтобы после застывания получить слой толщиной 3 – 5 мм, проверяли на стерильность двухсуточным выдерживанием в термостате при температуре 36±1 °С и хранили в течение 6 – 10 дней на свету при комнатной температуре.

Исходную споровую культуру из ампулы переносили в пробирку, разводили стерильным физиологическим раствором до концентрации 300 – 500 тыс. спор в 1 см³, прогревали 30 минут при 70 °С (тепловая активация спор) и засеивали во флаконы с мясопептонным бульоном или бульоном Хоттингера, которые помещали в термостат при 36±1 °С. Через 16 – 24 ч бульонную культуру проверяли на чистоту и специфичность роста – прозрачный сверху бульон с хлопьевидным осадком. При микроскопии в раздавленной капле наблюдали

нити и отдельные неподвижные палочки, а в окрашенных мазках – стройные, с обрубленными концами палочки или нити, равномерно воспринимающие окраску. Убедившись в чистоте роста и в отсутствии инволюционных форм, пересеивали на модифицированный (голодный) LB-агар в матрацах (предварительно из них удаляли конденсат). В каждый матрац вносили 10 – 15 см³ бульонной культуры, которую равномерно распределяли по поверхности агаровой среды. Посев в матрацы также можно производить споровой культурой непосредственно из ампулы, предварительно суспендируя ее в физиологическом растворе до концентрации 1×10⁶ спор в 1 см³ и прогревая 30 минут при 70 °С. Засеянные матрацы оставляли на 20 – 30 минут агаром вниз (до впитывания посевного материала), а затем переворачивали агаром вверх и инкубировали при 32±1 °С.

Во время роста культуры оценивали характер вегетативных микробных клеток и образование спор путем просмотра в микроскопе с помощью фазово-контрастного устройства раздавленной или висячей капли, а также мазков, окрашенных по Граму или Цилю-Нильсену. На 3 – 5-е сутки выращивания в матрацах проверяли типичность роста (толстая, шероховатая, матовая пленка, местами блестящая) и отсутствие роста посторонней микрофлоры. Такие исследования делали выборочно из 10 % матрацев или из всех матрацев для отбраковки культур с низким спорообразованием и с подозрением на загрязнение посторонней микрофлорой. При выявлении менее 70 – 80 % отдельно лежащих спор и большого количества синих спор матрацы вынимали из термостата и оставляли на двое суток в светлом месте при комнатной температуре. Если в мазке обнаруживали более 80 % отдель-

но расположенных розовоокрашенных спор и единичные красные и синие споры, из матрацев удаляли остатки посевной жидкости, наливали по 10 – 20 см³ стерильного 30 %-ного водного раствора химически чистого нейтрального глицерина или сахарозо-желатиновой среды, а затем вносили 15 – 20 стерильных стеклянных или фарфоровых бусинок. Переворачивали матрацы агаром вниз и давали полежать 10 – 15 минут, после чего матрацы осторожно встряхивали легкими круговыми движениями до полного смывания культуры со всей поверхности агара. Споровые суспензии с содержанием не менее 80 % спор переносили из матрацев в предварительно подготовленные стерильные бутылки, в пробке которых проходили три трубки: 1 – для забора культуры из матрацев (с мешочком на конце из батистовой ткани для фильтрации суспензии); 2 – воздушная трубка с фильтром; 3 – трубка для разлива культуры по ампулам, достигающая до дна бутылки. С одного матраца получали до 10 – 15 см³ культуры с содержанием 6 – 10×10⁹ спор в 1 см³.

Из полученной споровой суспензии отбирали пробу, в которой определяли морфологические и культуральные свойства, процентное содержание спор, общую концентрацию спор, количество жизнеспособных спор и другие показатели. Качество спор контролировали в мазке культуры, окрашенной по Цилю-Нильсену. При просмотре мазка в 10 полях зрения подсчитывали количество розовых (нормальных) спор, отдельно красных и синих, а также палочек. После этого рассчитывали процентное содержание спор, которое в стандартной споровой суспензии должно быть: 90 – 98 % нормальных спор (розовая окраска с большей интенсивностью по периферии, правильная вытянутая форма с закругленными концами); 3 – 5 %

спор округлой формы темно-синего цвета; 2 – 3 % прокрашенных (темно-красного цвета) спор; 1 – 2 % остатков вегетативных клеток.

При высеве на агаровые среды устанавливали количество живых спор, а общую их концентрацию – по ОСО мутности бактериальных взвесей ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России ОСО 42-28–85 (10 Е), а точнее – подсчетом в камере Горяева.

Затем культуру разливали по ампулам, которые запаивали и погружали на 2 ч в 10 %-ный раствор перекиси водорода. Герметичные ампулы мыли, сушили и маркировали с указанием микроорганизма, штамма, номера партии, концентрации спор и даты приготовления. Из партии отбирали три ампулы для контроля свойств (в сравнении с исходным музейным штаммом). Определяли следующие показатели по существующим методикам [4] с некоторыми изменениями: морфологические и культуральные свойства (окраска по Цилю-Нильсену, размеры и вид колоний на LB-агаре, характер роста в бульоне, подвижность бацилл); отсутствие посторонней микрофлоры микроскопией и высевам на питательные среды, проба с бактериофагом; биохимические свойства (гемолитическая, протеолитическая, лецитиназная, желатиназная активности и др.); общее количество спор (по счету в гемоцитометре – среднее из 15 определений); количество жизнеспособных спор по величине КОЕ (число колониеобразующих единиц при высеве серийных разведений на LB-агар в чашках Петри); устойчивость спор к прогреванию при 83 °С в течение 13 мин; капсулообразование (выращивание на бикарбонатном агаре в атмосфере CO₂) и заражение животных; вирулентность для лабораторных животных (по величине LD₅₀ для белых мышей). После оценки свойств

на каждую партию споровой культуры составляли паспорт. Споровую культуру хранили при температуре 2 ± 2 °С.

В микробиологической практике широкое применение нашел способ хранения культур *B. anthracis* в виде лиофильно высушенных спор. К споровой суспензии добавляли сахарозо-желатиновую смесь до конечной концентрации сахарозы 10 % и желатина – 1 % [4]. После разлива в ампулы споровую культуру замораживали не менее 24 ч при минус 45 °С и лиофилизировали 36 – 48 ч, в том числе 10 – 11 ч при 25 °С. Ампулы с сухим препаратом запаивали под вакуумом.

При многолетних наблюдениях установлена хорошая сохраняемость биологических свойств сибиреязвенными споровыми культурами в водно-глицериновой смеси при длительном хранении – до 60 лет [5].

Изучили сохраняемость спор в препаратах разных агрегатных состояний – в лиофильно высушенном и в 30 %-ном водном растворе глицерина. Сухая культура в ампулах имела вид пористой однородной массы, без запаха, слегка желтоватого цвета. Остаточная влажность составляла 3 – 4 %. Таблетка суспендировалась в дистиллированной воде 2 – 3 минуты, образуя равномер-

Таблица 1
Основные биологические свойства споровых культур *B. anthracis*

Характеристика	Вид культуры		
	Сухая	Жидкая	Исходная
Концентрация спор, 1×10^9 /см ³	9±2	11±1	10±2
КОЕ, 1×10^9 /см ³	7,3±0,3	7,6±0,2	8±0,2
Содержание спор, %	98 ±2	98±2	98±2
Морфология спор	Типичная	Типичная	Типичная
Морфология колоний	Типичная	Типичная	Типичная
LD ₅₀ для белых мышей, 1×10^5 спор	6,5 (6,1÷10,0)	7,5 (6,2÷8,6)	6,2 (5,8÷8,0)
Терморезистентность спор, %	72±15	70±12	75±13
Капсулообразование, %	0	0	0

Таблица 2
Эффективность споровых культур сибиреязвенной вакцины СТИ при заражении морских свинок

Вакцина	Заражение штаммом 71/12		Заражение штаммом Ч-7	
	LD ₅₀ спор	Индекс иммунитета	LD ₅₀ спор	Индекс иммунитета
СТИ жидкая	$4,7 \times 10^6$	4700	$6,8 \times 10^4$	1000
СТИ сухая	$5,2 \times 10^5$	5200	$4,7 \times 10^4$	690
Контроль	$1,0 \times 10^3$	–	68	–

ную суспензию без хлопьев и осадка. Жидкая культура представляла собой суспензию серовато-белого цвета с желтоватым оттенком, расслаивающуюся в статических условиях с образованием легко ресуспендируемого осадка.

Из приведенных в таблице 1 данных видно, что биологические свойства сухих и жидких споровых культур *B. anthracis* одинаковы и не отличаются от исходной культуры, хранившейся в 30 %-ном глицерине с 1956 г.

В эксперименте на морских свинках оценили иммуногенность сухих и жидких споровых культур сибиреязвенной вакцины СТИ. Животным подкожно вводили культуру в дозе 1×10^6 спор. Через 20 суток их заражали подкожно споровой культурой штамма 71/12 (второй вакцины Ценковского) или вирулентным штаммом Ч-7 в разных дозах. Контролем служили неиммунизированные особи. Через 10 суток наблюдения рассчитали величины LD_{50} в опытных и контрольной группах и по их соотношению определяли индекс иммунитета.

Результаты, представленные в таблице 2, свидетельствуют о том, что сухая и жидкая споровые культуры сибиреязвенной вакцины СТИ показали высокую иммунологическую эффективность. Индексы иммунитета при введении опытных образцов вакцин и заражении вирулентным штаммом практически одинаковы.

Заключение. В лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН ГНЦ ПМБ для выращивания и получения спор *B. anthracis* применяют модифицированный (голодный) LB-агар (по Луриа-Бертани). При культивировании на нем в течение 3–5 суток при 32 ± 1 °С получают более 10 млрд спор с 1 мл среды. По отработанной технологии были приготовлены споровые культуры в 30 %-ном глицерине 225

вирулентных и вакцинных штаммов *B. anthracis*, которые хранятся в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКМП-Оболенск». Споровые культуры, заложенные на хранение в 1956 и 1993 гг., сохранили все биологические, генетические, вирулентные и иммуногенные свойства. На основании изложенного можно сделать заключение о возможности хранения споровых культур в водно-глицериновой взвеси.

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коготкова О.И., Буравцева Н.П., Еременко Е.И. и др. Характеристика типичного вирулентного тест-штамма 81/1 *Bacillus anthracis*. Журн. Микробиол. 2005; 2:100–104.
2. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы. Методические указания Главного государственного санитарного врача РФ. МУК № 4.2.2413–2008. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009; 67 с.
3. Лабораторная диагностика сибирской язвы и идентификация *Bacillus anthracis*. Методические указания (Проект). Ставропольский ПЧИ, 2019; 31 с.
4. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Мокриевич А.Н. и др. Методы изучения биологических и молекулярно-генетических свойств возбудителя сибирской язвы. М.: Издательство «Династия», 2021; 240 с.
5. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Шишкова Н.А., Фирстова В.В. Сибирская язва вчера и сегодня. М.: Издательство «Династия», 2021; 648 с.
6. Угрюмов С.А., Лопаткин О.Н., Пивоварова Н.И. и др. Питательная среда для получения спор сибиреязвенного микроба. Патент на изобретение SU.1768634 А1. Бюлл. № 38 15.10.92. НПО «Аллерген» и НИПЧИ Кавказа и Закавказья.
7. Шереметьева Ю.В., Госманов Р.Г., Салмаков К.М. и др. Иммунобиологические свойства сибиреязвенных вакцинных штаммов Ланге столетней давности. Журн. Микробиол. 2004; 2:87, 88.



**Ветеринарная общественность
тепло поздравила с 75-летием
ИВАНА ИВАНОВИЧА КОЧИША,**

доктора сельскохозяйственных наук, профессора, академика РАН, дважды лауреата премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники.

Ивану Ивановичу 2 января 2026 г. исполнилось 75 лет со дня рождения. Он окончил с отличием Московскую ветеринарную академию имени К.И. Скрябина в 1975 г., с июня 1975 г. по май 1976 г. служил в рядах Советской армии (г. Луганск). После этого до октября 1981 г. был очным аспирантом и научным сотрудником Всесоюзного научно-исследовательского и технологического института птицеводства (ВНИТИП, г. Загорск Московской обл.). В Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина (ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина) работает с ноября 1981 г. по настоящее время, пройдя путь от ассистента до профессора кафедры генетики и разведения животных, заведующего кафедрой зооигиены и птице-

водства имени А.К. Даниловой, проректора по учебной работе (2008 – 2020 гг.). По приказу Министерства сельского хозяйства Российской Федерации (№ 147-КР от 11 сентября 2019 г.) временно исполнял обязанности ректора ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина». В 1984 – 2008 гг. был председателем объединенного профсоюзного комитета академии. С 1984 по 2008 г. избирался членом Горсовета профсоюза работников АПК г. Москвы, а с 1994 по 2008 г. – членом его президиума. В настоящее время он председатель Управляющего совета школы №1420 г. Москвы.

Академик РАН И.И. Кочиш работал по контракту с учеными Республики Кубы (1983 – 1984 гг.), проходил научно-методическую стажировку в транснациональной генетической фирме «Еврибрид» в Нидерландах (1981 г.).

В 2000 г. избран академиком Международной академии аграрного образования (МААО), в 2007 г. – член-корреспондентом РАСХН, в 2016 г. – академиком РАН, в 2010 г. – почетным профессором Национального аграрного университета Армении, а в 2023 г. – почетным профессором МВА имени К.И. Скрябина. При его непосредственном участии открыт Ереванский филиал Московской ветеринарной академии имени К.И. Скрябина в Армении.

Основные направления его научных исследований – разработка новых селекционно-генетических методов при разведении сельскохозяйственной птицы с использованием новейших интерьерных, физиолого-биохимических и этологических тестов; усовершенствование принципов индексной селекции, отбора и подбора кур, индеек и уток; создание кроссов птицы для получения высокопродуктивных гибридов; разработка эффективных ресурсосберегающих и экологически безопасных технологий производства животноводческой продукции.

За цикл работ «Разработка и усовершенствование ресурсосберегающих и экологически безопасных технологий производства яиц и мяса сельскохозяйственной птицы» в 2004 г. ему присуждена премия Правительства Российской Федерации в области науки и техники.

На кафедре зоогиены и птицеводства им. А.К. Даниловой при непосредственном участии И.И. Кочиша создана Международная лаборатория молекулярной генетики и геномики птицы (2017 г.). Основными направлениями ее исследований являются: создание современных биотехнологий для оценки экспрессии генов, связанных с продуктивностью и устойчивостью птицы к неблагоприятным факторам; разработка системы мониторинга бактерий – патогенов на различных стадиях технологического процесса выращивания и содержания кур; оценка воздействия кормовых добавок различных типов на микрофлору кишечника и продуктивность птицы яичного и мясного направления; разработка системы профилактики бактериальных патогенов у кур-несушек на основе применения пробиотиков и фитобиотиков, заменяющих антибиотики.

В 2017 – 2020 гг. получен перечень отобранных 34 генов, участвующих в формировании признаков продуктивности кур-несушек, разработаны методики определения экспрессии генов, связанных с продуктивными признаками у кур-несушек, при помощи ПЦР-РВ и изменений микробиома кишечника методом NGS-секвенирования, которые позволяют оценивать воздействие кормовых добавок различных типов на микрофлору кишечника и продуктивность птицы. В 2021 – 2025 гг. были проведены производственные опыты на сельскохозяйственной птице по изучению влияния кормовых добавок на экспрессию генов продуктивности и резистентности, в том числе на птице отечественного кросса кур «Смена-9». За комплексную работу «Разработка современных технологий для повышения

продуктивности сельскохозяйственных животных, улучшения качества животноводческой продукции, эффективной охраны экосистем с учетом регуляции микробиома» в 2017 г. академику РАН И.И. Кочишу присвоена вторая премия Правительства РФ в области науки и техники.

И.И. Кочиш в 2013 – 2022 гг. был председателем экспертного совета по зоотехническим и ветеринарным наукам ВАК РФ, членом Всемирной научной ассоциации по птицеводству (ВНАП), советником ВАК при Минобрнауки РФ, членом экспертной комиссии по вопросам испытания и охраны селекционных достижений в животноводстве МСХ РФ, членом семи редколлегий отраслевых журналов, председателем и членом трех диссертационных советов по защите докторских и кандидатских диссертаций.

Иван Иванович опубликовал более 850 научных и учебно-методических работ, из них 55 книг, в том числе 18 учебников для аграрных вузов страны и 92 работы в зарубежных изданиях. Он имеет 55 патентов и авторских свидетельств на изобретения, индекс Хирша по публикациям в РИНЦ – 35. Под научным руководством И.И. Кочиша подготовлено 25 кандидатов и 3 доктора наук, в том числе для дружественных стран (Египет, Казахстан, Белоруссия). Академик РАН И.И. Кочиш – лауреат национальной экологической премии «ЭкоМир» (2009) в номинации «Экологическое образование и просвещение». Он имеет государственные награды: медаль ордена «За заслуги перед Отечеством» 2 степени (1999); медаль ордена «За заслуги перед Отечеством» 1 степени (2013); медаль «В память 850-летия Москвы» (1997), многие ведомственные и памятные медали.

***Редакционная коллегия журнала,
коллеги и друзья***

В адрес юбиляра поступили многочисленные пожелания доброго здоровья и дальнейших творческих успехов.



ВЕТЕРИНАРИЯ В АГРОПРОМЫШЛЕННОМ КОМПЛЕКСЕ

XV Международная
научно-практическая конференция

ВЕТЕРИНАРИЯ В АПК 2-4 ИЮНЯ 2026

СОЗДАЁМ КОМФОРТНОЕ ПРОСТРАНСТВО
ДЛЯ ЖИВОГО ОБЩЕНИЯ И РЕШЕНИЯ РЕАЛЬНЫХ ЗАДАЧ АПК



НОВОСИБИРСК
ЭКСПО ЦЕНТР

НОВОСИБИРСК, УЛ. СТАНЦИОННАЯ, 104

ОТСКАНИРУЙТЕ
И УЗНАЙТЕ
ПОДРОБНОСТИ

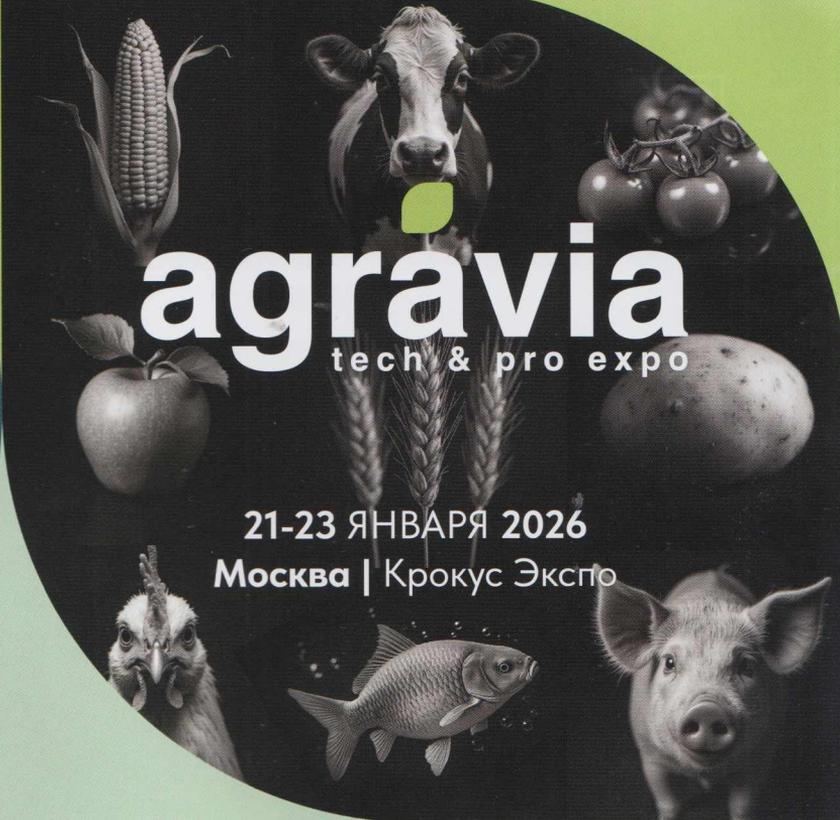


МЕЖДУНАРОДНАЯ
ВЫСТАВКА ТЕХНОЛОГИЙ
ПРОИЗВОДСТВА
И ПЕРЕРАБОТКИ
ДЛЯ ПРОФЕССИОНАЛОВ
АПК

Ранее:

Agros
expo

AgroTech
КАРТОФЕЛЬ
ОВОЩИ, ПЛОДЫ expo



agravia

tech & pro expo

21-23 ЯНВАРЯ 2026

Москва | Крокус Экспо

НОВЫЙ ГЛОБАЛЬНЫЙ ФОРМАТ ОТ ПОЛЯ И ФЕРМЫ ДО ПЕРЕРАБОТКИ: ВСЕ КЛЮЧЕВЫЕ
ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ АГРОПРОМА ТЕПЕРЬ НА ОДНОЙ ПЛОЩАДКЕ РЕШАЙТЕ ЗАДАЧИ
ВО ВСЯХ СФЕРАХ ВАШЕГО АГРОБИЗНЕСА КОМПЛЕКСНО В НАЧАЛЕ ГОДА НА AGRAVIA

ЖИВОТНОВОДСТВО И ПЕРЕРАБОТКА

a:livestock & poultry

Племенное дело и Технологии для Молочного и Мясного Скотоводства, Свиноводства, Птицеводства и др. видов Животноводства, Кормопроизводства, Мясопереработки

ГЕНЕТИКА · ТЕХНИКА И ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ СОДЕРЖАНИЯ И КОРМЛЕНИЯ · ДОИЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ · УПРАВЛЕНИЕ ОТХОДАМИ · СТРОИТЕЛЬСТВО · КОРМОПРОИЗВОДСТВО И КОРМОЗАГОТОВКА · ПЕРЕРАБОТКА ЖИВОТНОГО БЕЛКА · СБЫТ

a:feed & health

Кормовые решения, Продукты Ветеринарии, Комбикормовое Оборудование

КОРМА, КОМПОНЕНТЫ КОРМОВ · КОРМОВЫЕ ДОБАВКИ · КОНЦЕНТРАТЫ · ПРЕМИКСЫ · РАЦИОНЫ И ТЕХНОЛОГИИ КОРМЛЕНИЯ · ВЕТЕРИНАРНЫЕ ПРЕПАРАТЫ И ВАКЦИНЫ · ВЕТЕРИНАРНЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И ОБОРУДОВАНИЕ · ОБОРУДОВАНИЕ И ПРОДУКТЫ ДЛЯ ОЧИСТКИ И ДЕЗИНФЕКЦИИ · СРЕДСТВА ЗАЩИТЫ ОТ ВРЕДИТЕЛЕЙ · КОМБИКОРМОВОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

РАСТЕНИЕВОДСТВО И ПЕРЕРАБОТКА

a:field crops

Технологии Производства и Переработки Зерновых, Зернобобовых, Масличных, Кормовых, Технические и Специальных Полевых Культур

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ ТЕХНИКА И ОБОРУДОВАНИЕ · СЕЛЕКЦИЯ · СЕМЕНОВОДСТВО · СЗР, УДОБРЕНИЯ · ПОСТУБОРОЧНАЯ ОБРАБОТКА · ХРАНЕНИЕ И ЛОГИСТИКА · ЗАПЧАСТИ, РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, ГСМ · ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ПЕРЕРАБОТКИ · СТРОИТЕЛЬСТВО · СБЫТ

a:potato & horti

Технологии Производства и Переработки Картофеля, Овощей Открытого и Закрытого Грунта, Фруктов и Ягод

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ ТЕХНИКА, ОБОРУДОВАНИЕ · СЕЛЕКЦИЯ · СЕМЕНОВОДСТВО · СЗР, УДОБРЕНИЯ · ПОСТУБОРОЧНАЯ ОБРАБОТКА · ХРАНЕНИЕ И ЛОГИСТИКА · ЗАПЧАСТИ, РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, ГСМ · СТРОИТЕЛЬСТВО И ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ТЕПЛИЦ · ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ПЕРЕРАБОТКИ · СТРОИТЕЛЬСТВО · СБЫТ





Фуринайд Furinaid



**ЗАЩИТА СЛИЗИСТОЙ
ОБОЛОЧКИ
МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ**

**ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ЦИСТИТОВ
ЛЮБОЙ ПРИРОДЫ**

Производитель: «Thoroughbred Remedies Manufacturing Ltd.», Ирландия
Перед применением ознакомиться с инструкцией.

Номер регистрационного свидетельства в РФ: 21-2278-251124

ISSN 0042 – 4846. Ветеринария. 2026. № 1. 1 – 60. 560 р. Индекс ПИ396; 70130