

matsionnym agentstvom AgriTimes.ru pri podderzhke Ministerstva selskogo khoziaistva Rossiiskoi Federatsii i sponsorskom uchastii kompanii «DeLaval», Sankt-Peterburg, 13 avgusta 2014 g. // Elektronnyi resurs // <http://www.agritimes.ru>.

5. Lopez-Gatius, F., Santolaria P., Yániz J.L. (2012). Economics of fertility in dairy cattle: Current situation and future challenges. *Reproduction in Domestic Animals*, 157-160.

6. Muller, C., Cloete, S., Botha, J.A.. (2018). Fertility in dairy cows and ways to improve it. *South African Journal of Animal Science*. 48. 859-868. DOI: 10.4314/sajas.v48i5.6.

7. Ovchinnikova, L. Vliianie lineinoi prinadlezhnosti korov na ikh produktivnoe dolgoletie / L. Ovchinnikova // Molochnoe i miasnoe skotovodstvo. – 2008. – No. 1. – S. 7-8.

8. Syrtseva, E.M. Nasledstvennaia predraspolozhennost cherno-pestrykh korov k prichinam

vybrakovki / E.M. Syrtseva // *Biologiya v selskom khoziaistve*. – 2014. – No. 1. – S. 19-22.

9. Kazantseva, E. Pokazateli produktivnogo dolgoletia korov cherno-pestroi porody v zavisimosti ot lineinoi prinadlezhnosti / E. Kazantseva // *Agrarnyi vestnik Urala*. – 2015. – No. 6. – S. 51-53.

10. Ulimbashev, M.B. Vosproizvoditelnye kachestva cherno-pestrogo i golshtinskogo skota raznoi selektsii / M.B. Ulimbashev, Zh.T. Alagirova // *Zootekhnika*. – 2016. – No. 4. – S. 28-29.

11. Kostomakhin, N. Molochnaia produktivnost i vosproizvoditelnye kachestva korov raznykh linii v plemennykh khoziaistvakh Kaluzhskoi oblasti / N. Kostomakhin, O. Voronkova, M. Gabedava, T. Pimkina // *Glavnyi zootekhnik*. – 2017. – No. 5. – S. 17-19.

12. Korosteleva, N.I. Biometriia v zhivotnovodstve: uchebnoe posobie / N.I. Korosteleva, I.S. Kondrashkova, N.M. Rudishina, I.A. Kamardina. – Barnaul: Izd-vo AGAU, 2009. – 210 s.



УДК 579.62

DOI: 10.53083/1996-4277-2023-230-12-55-59

**Е.А. Анисимова, Е.А. Додонова, Д.А. Миргазов,
Н.А. Фахрутдинов, И.А. Елизарова,
Е.В. Панкова, К.А. Осянин**
Е.А. Anisimova, Е.А. Dodonova, D.A. Mirgazov,
N.A. Fakhrutdinov, I.A. Elizarova,
E.V. Pankova, K.A. Osyenin

ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ПОСТАНОВКИ ПЦР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА СОБАК

SELECTION OF OPTIMAL CONDITIONS OF PCR SETUP TO IDENTIFY CANINE BRUCELLOSIS CAUSATIVE AGENT

Ключевые слова: бруцеллез собак, ПЦР в реальном времени, зооноз, диагностика, идентификация дифференциация, *Brucella canis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*.

Бруцеллез собак – зоонозное заболевание, оказывающее негативное влияние на репродуктивную систему данных животных и, как следствие, приводящее к значительным экономическим потерям питомников. Заболевание представляет опасность и для здоровья человека, особенно для ветеринарных работников и заводчиков. Диагностические исследования при бруцеллезе в большинстве своем основаны на серологических и фенотипических методах, являющихся достаточно трудоемкими и обладающих низкой специфичностью. Наиболее совершенными являются молекулярно-генетические подходы, в частности, разновидности метода ПЦР, основу которого составляет биоинформационный анализ. В рамках данной работы проанализированы полногеномные последовательности геномов бруцелл, представленных в базе данных GenBank. По результатам проведенного анализа по-

добраны локусы, одни из которых имеются лишь у представителей видов *B. canis*, другие – у *B. abortus*, третьи – у *B. melitensis*. На основе выбранных ДНК-маркеров сконструированы праймеры и TagMan-зонды, позволяющие выявлять и проводить дифференциацию видов возбудителя бруцеллеза. Также подобран оптимальный состав реакционной смеси и определены единые условия амплификации, позволяющие проводить ПЦР в условиях одной реакции. При постановке мультиплексной ПЦР с ДНК штаммов различных видов установлено, что олигонуклеотидные затравки, разработанные для амплификации представителей видов *B. abortus* и *B. melitensis*, обладают 100%-ной специфичностью. В свою очередь, сконструированные для детекции основного возбудителя бруцеллеза собак (*B. canis*) праймеры также пригодны для выявления бактерий *B. suis*. Таким образом, разработанные праймеры и TagMan-зонды могут быть включены в состав ПЦР-РВ диагностикума, пригодного не только для индикации основного вида возбудителя бруцеллеза собак – *B. canis*, но и «нетипичных» для данных животных видов *B. suis*, *B. abortus* и *B. melitensis*.

Keywords: canine brucellosis, real-time PCR, zoonosis, diagnostics, identification, differentiation, *Brucella canis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*.

Canine brucellosis is a zoonotic disease that has a negative impact on the reproductive system of dogs and leads to significant economic losses of breeding kennels. The disease also poses a threat to human health, especially for veterinarians and breeders. Diagnostic tests for brucellosis are mostly based on serological and phenotypic methods which are quite laborious and have low specificity. The most advanced methods include molecular genetic approaches, in particular, PCR varieties based on bioinformatics assay. In this study, we have carried out assay of whole genome sequences of *Brucella* genomes presented in the GenBank database. Based on the results of the assay, loci were selected, some of which were present only in representatives of the species *B. canis*, others in *B. abortus*, and others in *B. melitensis*. Based on the se-

lected DNA markers, primers and TagMan probes to allow detection and differentiation of brucellosis pathogen species were designed. Also, the optimal composition of the reaction mixture was selected and uniform amplification conditions were determined allowing PCR to be carried out under the conditions of one reaction. When performing multiplex PCR with DNA of strains of various species, it was found that oligonucleotide primers designed for amplification of representatives of the species *B. abortus* and *B. melitensis* had 100% specificity. In turn, primers designed to detect the main causative agent of canine brucellosis (*B. canis*) are also successful for amplification of *B. suis* bacteria. Thus, the developed primers and TagMan probes may be included in the real-time PCR diagnostic kit, suitable not only for indicating the main type of the causative agent of canine brucellosis - *B. canis*, but also "atypical" for these animals species *B. suis*, *B. abortus* and *B. melitensis*.

Анисимова Елизавета Алексеевна, к.б.н., ст. науч. сотр., ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань, Российская Федерация, e-mail: elizaveta-real@mail.ru.

Додонова Екатерина Алексеевна, мл. науч. сотр., ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань, Российская Федерация, e-mail: dodonovaekaterina82@gmail.com.

Миргазов Динис Анатолиевич, мл. науч. сотр., ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань, Российская Федерация, e-mail: dinis.mirgazov.96@mail.ru.

Фахрутдинов Наиль Анисович, мл. науч. сотр., ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань, Российская Федерация, e-mail: siam93@mail.ru.

Елизарова Инна Анатольевна, мл. науч. сотр., ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань, Российская Федерация, e-mail: eliinna@yandex.ru.

Панкова Екатерина Витальевна, к.б.н., вед. науч. сотр., ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань, Российская Федерация, e-mail: katerinka_ja@bk.ru.

Осянин Константин Анатольевич, к.б.н., вед. науч. сотр., ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань, Российская Федерация, e-mail: kostja-2003@yandex.ru.

Anisimova Elizaveta Alekseevna, Cand. Bio. Sci., Senior Researcher, Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation, e-mail: elizaveta-real@mail.ru.

Dodonova Ekaterina Alekseevna, Junior Researcher, Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation, dodonovaekaterina82@gmail.com.

Mirgazov Dinis Anatolievich, Junior Researcher, Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation, e-mail: dinis.mirgazov.96@mail.ru.

Fakhrutdinov Nail Anisovich, Junior Researcher, Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation, e-mail: siam93@mail.ru.

Elizarova Inna Anatolevna, Junior Researcher, Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation, e-mail: eliinna@yandex.ru.

Pankova Ekaterina Vitalevna, Cand. Bio. Sci., Leading Researcher, Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation, e-mail: katerinka_ja@bk.ru.

Osyenin Konstantin Anatolevich, Cand. Bio. Sci., Leading Researcher, Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation, e-mail: kostja-2003@yandex.ru.

Введение

Бруцеллез – особо опасное зоонозное заболевание, возбудителем которого являются бактерии рода *Brucella* [1]. Основным источником заражения людей данным заболеванием являются инфицированные сельскохозяйственные животные, однако важное эпизоотическое и эпидемиологическое значение в мире приобретает бруцеллез собак, инфекционным агентом которого являются бактерии *Brucella canis* [2]. Заражение бактериями *B. canis* чаще всего приводит к развитию у собак таких заболеваний, как дискоспондилит, увеит и эпидидимит [3]. Данные

болезни значительно сокращают репродуктивные способности кобелей и являются причиной абортос и гибели ценных в породном отношении щенков, что наносит значительный экономический ущерб собаководству [4]. Что касается людей, бруцеллез собак считается профессиональным заболеванием, поражающим, как правило, ветеринаров, работников питомников и лабораторий [5]. Однако в литературе также описаны случаи инфицирования владельцев животных [6, 7].

В большинстве случаев *B. canis* вызывает субклиническую инфекцию, что делает диагностику дан-

ного заболевания достаточно сложной задачей [5]. С другой стороны, для выявления возбудителя бруцеллеза преимущественно применяют серологические и фенотипические методы, которые являются достаточно трудоемкими и часто имеют низкую специфичность. Наиболее совершенным подходом к диагностике является применение основанных на ПЦР методов, позволяющих проводить быструю идентификацию возбудителя [8]. Разработанные предыдущими исследователями ПЦР-подходы к выявлению возбудителя бруцеллеза собак основаны преимущественно на детекции основного возбудителя данного заболевания, а именно *B. canis* [9, 10]. Согласно данным литературы, заболевание у собак бруцеллезом также может быть связано с их инфицированием еще тремя видами, а именно *B. abortus*, *B. suis* и *B. melitensis* [4, 5]. Следовательно, универсальным подходом для диагностики бруцеллеза собак является применение ПЦР-диагностикума, способного выявлять все четыре вида возбудителя одновременно.

Целью исследования являлся подбор оптимальных локусов геномов бруцелл, пригодных для идентификации и дифференциации видов возбудителя бруцеллеза собак в режиме реального времени.

Объекты и методы

В исследовании использовали штаммы *B. canis* RM 6/66, *B. suis* 1330 (bv.1), *B. suis* 183-1 (bv.2), *B. suis* Y-1 (bv.3), *B. abortus* R-1096, *B. melitensis* 16M и *B. ovis* 076772 из «Государственной коллекции штаммов возбудителей ООБ, используемых в ветеринарии и животноводстве» ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». Подготовку проб для выделения ДНК проводили согласно МУК 3.1.7.3402-16 «Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза». Для выделения ДНК использовали комплект реагентов «ДНК-сорб-В» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора). ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили на ДНК-амплификаторе С1000 с оптическим блоком CFX96 («Bio-Rad», Сингапур) с применением готовой реакционной смеси 5x qPCRmix-HS («Евроген», Россия). Биоинформационный анализ и конструирование праймеров осуществляли с помощью программ Vector NTI 9.1 и баз данных ресурсов NCBI (<https://www.ncbi.gov>). Праймеры и TaqMan-зонды синтезированы в ЗАО «Синтол» (Россия). *In silico* оценку специфичности праймеров, зондов и ожидаемых продуктов амплификации проводили с помощью BLAST-анализа.

Результаты исследований их обсуждения

На первом этапе работы с целью подбора ДНК-мишеней, пригодных для индикации и дифференциации штаммов видов *B. canis*, *B. suis*, *B. abortus* и

B. Melitensis, провели биоинформационный анализ геномов бруцелл, представленных в базах данных GenBank. На основании проведенного поиска для детекции штаммов вида *B. canis* был подобран локус «BCAN_B0548», для *B. abortus* – «BAW-20082», для *B. melitensis* – «C0R52_12390». В пределах данных локусов разработали олигонуклеотидные праймеры и TaqMan-зонды, пригодные для видовой идентификации возбудителя бруцеллеза методом ПЦР в режиме реального времени. Отметим, что характерный для *B. canis* локус «BCAN_B0548» имеет высокую гомологию с последовательностями *B. suis* (до 96,3%) из базы данных GenBank, поэтому мы предположили, что разработанные для детекции *B. canis* праймеры имеют потенциал использования не только для выявления *B. canis*, но и *B. suis*. Информация о подобранных локусах, красителях, гасителях флуоресценции представлена в таблице 1.

При конструировании олигонуклеотидных затравок руководствовались следующими критериями: единые условия амплификации для одновременно проведения ПЦР (температура плавления праймеров не должна отличаться более чем на 0,5°C), минимум димеров и шпилек, не более пяти Г/Ц нуклеотидов на 3' конце праймеров, отсутствие Г нуклеотида на 5' конце TaqMan-зонда.

In silico установили, что температура отжига для всех сконструированных праймеров составила 60°C, а зондов 64°C. Для определения точной температуры отжига праймеров были проведены моноплексные реакции с использованием температурного градиента, включающего в себя диапазон температур от 58 до 65°C. Подбор проводили на штаммах *B. canis* RM 6/66, *B. abortus* R-1096 и *B. melitensis* 16M. После чего была составлена рабочая программа амплификации: первичная денатурация ДНК при 95°C в течение 5 мин., далее 40 циклов: денатурация 94°C – 15 с, отжиг олигонуклеотидов 61°C – 35 с (учет флуоресцентного сигнала по каналам Cy5/Rox/HEX).

На основании проведенных реакций был определен оптимальный состав реакционной смеси для проведения реакции в мультиплексном формате, обеспечивающий стабильное нарастание уровня флуоресценции по соответствующим каналам (табл. 2). Также были установлены максимальные величины порогового цикла (C_1), при которых результат считается достоверным: ≤ 30 для Cy5 и ≤ 32 для ROX и HEX.

Определение специфичности разработанных праймеров проводили в мультиплексном формате с использованием ДНК штаммов бруцелл, представленных в разделе «Материалы и методы». Результаты, полученные после амплификации маркерных локусов бруцелл, представлены в таблице 3.

Таблица 1

Характеристика разработанных праймеров и зондов

Обозначение комбинации праймеров и зонда	Вид – мишень	Локус	Канал детекции	Тип зонда и гасителя флуоресценции
Ca/Su	<i>B. canis</i> / <i>B. suis</i>	BCAN_B0548	Cy5	Cy5-ВНQ3
Abr	<i>B. abortus</i>	BAW-20082	Rox	Rox-ВНQ2
Mel	<i>B. melitensis</i>	C0R52_12390	HEX	R6G-ВНQ1

Таблица 2

Состав реакционной смеси для проведения ПЦР в мультиплексном формате

Обозначение праймера/зонда	Концентрация, пкМ	Реакционная смесь, мкл		
		5x qPCRmix-HS	ДНК	miliQ
Ca/Su (прямой)	0,3	3	5	До 15
Ca/Su (обратный)	0,3			
Ca/Su (зонд)	0,1			
Abr (прямой)	0,3			
Abr (обратный)	0,3			
Abr (зонд)	0,1			
Mel (прямой)	0,3			
Mel (обратный)	0,3			
Mel (зонд)	0,1			

Таблица 3

Результаты проведения ПЦР-амплификации

Штамм	Канал детекции		
	Cy5	ROX	HEX
<i>B. canis</i> RM 6/66	+	-	-
<i>B. suis</i> 1330 (bv.1)	+	-	-
<i>B. suis</i> 183-1(bv.2)	+	-	-
<i>B. suis</i> У-1 (bv.3)	+	-	-
<i>B. abortus</i> R-1096	-	+	-
<i>B. melitensis</i> 16М	-	-	+
<i>B. ovis</i> 076772	-	-	-

При проведении ПЦР-РВ с ДНК штаммов *B. abortus* R-1096 и *B. melitensis* 16М наблюдали ожидаемую флуоресценцию по каналу ROX и HEX соответственно. При проведении амплификации с ДНК *B. canis* RM 6/66 и *B. suis* (1330, 183-1, У-1) установлено стабильное нарастание уровня флуоресценции по каналу Cy5. Согласно данным литературы, виды *B. canis* и *B. suis* зачастую действительно невозможно дифференцировать друг от друга молекулярно-генетическими методами, ввиду высокой гомологии нуклеотидных последовательностей их геномов [2]. Следовательно, разработанные праймеры могут быть использованы для единовременного выявления видов *B. suis* и *B. canis* в одной пробирке. Для штамма *B. ovis* 076772, выбранного нами в качестве отрицательного контроля, флуоресценция не регистрировалась ни по одному из использованных каналов.

Заключение

Подобранные в рамках данной работы специфические ДНК-мишени и сконструированные на их основе олигонуклеотидные затравки могут быть ис-

пользованы для построения мультиплексной ПЦР тест-системы, пригодной для выявления и одновременной дифференциации возбудителей бруцеллеза собак. Применение такой тест-системы значительно ускорит процесс диагностики данного заболевания, а также позволит выявить у собак не только *B. canis* – основной источник инфекции, но и «нетипичные» для псовых виды *B. suis*, *B. abortus* и *B. melitensis*.

Библиографический список

1. Бруцеллез: его распространение и профилактика / Р. Ю. Насибуллин, Л. А. Тухватуллина, Я. А. Богова [и др.]. – Текст: непосредственный // Ветеринарный врач. – 2021. – № 1. – С. 38-43.
2. Кулаков, Ю. К. Молекулярно-генетическая характеристика изолятов бруцелл, выделенных от собак и оленей в различных регионах России / Ю. К. Кулаков, Л. Е. Цирельсон, М. М. Желудков. – Текст: непосредственный // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2014. – № 4. – С. 28-33.
3. Egloff, S., Schneeberger, M., Gobeli, et al. (2018). *Brucella canis* infection in a young dog with epididymitis and orchitis. *Brucella canis* Infektion eines jungen Hundes mit Epididymitis und Orchitis. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, 160 (12), 743–748. <https://doi.org/10.17236/sat00190>.
4. Зинова, А. А. Диагностика бруцеллеза собак, вызываемого *Brucella canis* (обзор литературы) / А. А. Зинова. – Текст: непосредственный // Ветеринарная патология. – 2006. – № 3 (18). – С. 11-14.
5. Mol, J. P. S., Guedes, A. C. B., Eckstein, C., et al. (2020). Diagnosis of canine brucellosis: comparison of various serologic tests and PCR. *Journal of Veterinary*

Diagnostic Investigation, 32 (1), 77–86. <https://doi.org/10.1177/1040638719891083>.

6. Dentinger, C. M., Jacob, K., Lee, L. V., et al. (2015). Human *Brucella canis* Infection and Subsequent Laboratory Exposures Associated with a Puppy, New York City, 2012. *Zoonoses and Public Health*, 62(5), 407–414. <https://doi.org/10.1111/zph.12163>.

7. Lucero, N. E., Corazza, R., Almuzara, et al. (2010). Human *Brucella canis* outbreak linked to infection in dogs. *Epidemiology and Infection*, 138 (2), 280–285. <https://doi.org/10.1017/S0950268809990525>.

8. Дифференциация штаммов *Brucella suis* и *Brucella melitensis* методом HRM-анализа / Д. А. Миргазов, Е. А. Анисимова, И. А. Елизарова [и др.]. – Текст: непосредственный // Инновационные решения актуальных вопросов биобезопасности: сборник материалов Международной научно-практической конференции, Казань, 02 декабря 2022 года. – Казань: Альянс, 2022. – С. 209-213.

9. Kauffman, L. K., Bjork, J. K., Gallup, J. M., et al. (2014). Early detection of *Brucella canis* via quantitative polymerase chain reaction analysis. *Zoonoses and Public Health*, 61 (1), 48–54. <https://doi.org/10.1111/zph.12041>.

10. Kang, S. I., Lee, S. E., Kim, J. Y., et al. (2014). A new *Brucella canis* species-specific PCR assay for the diagnosis of canine brucellosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 37 (4), 237–241. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2014.07.003>.

References

1. Brutsellez: ego rasprostranenie i profilaktika / R. Iu. Nasibullin, L. A. Tukhvatullina, I. A. Bogova [i dr.] // *Veterinarnyi vrach*. – 2021. – No. 1. – С. 38-43.

2. Kulakov Iu. K. Molekuliarno-geneticheskaia kharakteristika izolyatov brutsell, vydelennykh ot sobak i olenei v razlichnykh regionakh Rossii / Iu. K. Kulakov, L. E. Tsirelson, M. M. Zheludkov // *Molekuliarnaia genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. – 2014. – No. 4. – С. 28-33.

3. Egloff, S., Schneeberger, M., Gobeli, et al. (2018). *Brucella canis* infection in a young dog with epididymitis and orchitis. *Brucella canis Infektion eines jungen Hundes mit Epididymitis und Orchitis*. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, 160 (12), 743–748. <https://doi.org/10.17236/sat00190>.

4. Zinova A. A. Diagnostika brutselleza sobak, vyzyvaemogo *Brucella canis* (obzor literatury) / A. A. Zinova // *Veterinarnaia patologiya*. – 2006. – No. 3 (18). – С. 11-14.

5. Mol, J. P. S., Guedes, A. C. B., Eckstein, C., et al. (2020). Diagnosis of canine brucellosis: comparison of various serologic tests and PCR. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32 (1), 77–86. <https://doi.org/10.1177/1040638719891083>.

6. Dentinger, C. M., Jacob, K., Lee, L. V., et al. (2015). Human *Brucella canis* Infection and Subsequent Laboratory Exposures Associated with a Puppy, New York City, 2012. *Zoonoses and Public Health*, 62(5), 407–414. <https://doi.org/10.1111/zph.12163>.

7. Lucero, N. E., Corazza, R., Almuzara, et al. (2010). Human *Brucella canis* outbreak linked to infection in dogs. *Epidemiology and Infection*, 138 (2), 280–285. <https://doi.org/10.1017/S0950268809990525>.

8. Differentsiatsiia shtammov *Brucella suis* i *Brucella melitensis* metodom HRM-analiza / D. A. Mirgazov, E. A. Anisimova, I. A. Elizarova [i dr.] // *Innovatsionnye resheniya aktualnykh voprosov biobezopasnosti: sbornik materialov Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii*, Kazan, 02 dekabria 2022 goda. – Kazan: Alians, 2022. – С. 209-213.

9. Kauffman, L. K., Bjork, J. K., Gallup, J. M., et al. (2014). Early detection of *Brucella canis* via quantitative polymerase chain reaction analysis. *Zoonoses and Public Health*, 61 (1), 48–54. <https://doi.org/10.1111/zph.12041>.

10. Kang, S. I., Lee, S. E., Kim, J. Y., et al. (2014). A new *Brucella canis* species-specific PCR assay for the diagnosis of canine brucellosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 37 (4), 237–241. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2014.07.003>.



УДК 636.2.034

DOI: 10.53083/1996-4277-2023-230-12-59-64

**А.М. Булгаков, Д.А. Булгакова, К.Я. Мотовилов,
П.И. Барышников, Н.М. Понамарев**
**A.M. Bulgakov, D.A. Bulgakova, K.Ya. Motovilov,
P.I. Baryshnikov, N.M. Ponomarev**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ BIOTEХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЁМОВ ПРИ ЗАГОТОВКЕ КОРМОВ

USE OF BIOTECHNOLOGICAL TECHNIQUES IN FORAGE CONSERVATION

Ключевые слова: консерванты, Биосиб, Пробактил, органические кислоты, бактерии молочнокислые, бактерии пропионокислые, энергетическая ценность, протеин.

Keywords: preservatives, Biosib preservative, Probiactil preservative, organic acids, lactic-acid bacteria, propionic bacteria, energy value, protein.