

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций. Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ № ФС77-36472 от 3 июня 2009 г. Журнал включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий ВАК Министерства образования и науки РФ

ОГЛАВЛЕНИЕ

Главный редактор

Чуваев И. В.,
канд. биол. наук
e-mail: virclin@mail.ru

Редакционный совет

Алиев А. А.,
проф., докт. вет. наук

Андреева Н. Л.,
проф., докт. биол. наук

Белова Л. М.,
проф., докт. биол. наук

Васильев Д. Б.,
докт. вет. наук

Воронин В. Н.,
проф., докт. биол. наук

Концевая С. Ю.,
проф., докт. вет. наук

Кудряшов А. А.,
проф., докт. вет. наук

Кузьмин В. А.,
проф., докт. вет. наук

Панин А. Н.,
проф., докт. вет. наук,
акад. РАН

Прудников В. С.,
проф., докт. вет. наук,

Сулейманов С. М.,
проф., докт. вет. наук,
заслуж. деятель науки РФ

Яшин А. В.,
проф., докт. вет. наук

По вопросам рекламы
обращайтесь:
e-mail: virclin@mail.ru

Заявки на подписку (с любого
месяца) направляйте в редакцию
по факсу: (812) 232-55-92;
e-mail: invetbio@yandex.ru.
Телефон отдела подписки:
(812) 232-55-92

Верстка
Кондрашенков С. В.
Корректурa
Бушарова Ю. В.

Журнал основан в 2009 г.
Учредитель и издатель:
ЧОУДПО «Институт
Ветеринарной Биологии»

ЭМБРИОЛОГИЯ

Беляков А. А., Федорова Н. Н., Каниева Н. А., Грушко М. П.
Формирование систем органов шемаи (*Chalcalburnus chalcoides*) на 7-м этапе эмбрионального развития 3

Пирог А. В., Ложниченко О. В.
Особенности развития дыхательной системы клариевых сомов (*Clariidae*) на ранних этапах онтогенеза 7

Чумасов Е. И., Петрова Е. С., Коржевский Д. Э.
Изучение строения развивающегося эпикарда и особенностей васкуляризации в сердце новорожденных крыс 12

ВИРУСОЛОГИЯ

Доронин М. И., Медведева Н. Н., Гусева М. Н., Шишкова А. А., Михалишин Д. В.
Способ определения концентрации частиц штамма «А/КУТИ/2013» вируса ящура в сырье для вакцины методом обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией 19

Завьялова Е. А., Карпова М. А., Дрошнев А. Е.
Твёрдофазный иммуноферментный анализ в диагностике вирусных болезней лососевых рыб 25

ЭПИЗООТОЛОГИЯ

Сулейманов С. М., Паршин П. А., Павленко О. Б., Слободяник В. И., Климов Н. Т.
Эпизоотологические аспекты и клинико-морфологическая диагностика болезней органов пищеварения бактериальной этиологии у поросят 30

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

Леденев О. А., Ложниченко О. В.
Особенности гистологического строения желудочно-кишечного тракта рыб Черного моря 36

ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНЕЙ

Цыганский Р. А.
Артефакты при ультразвуковом исследовании пищеварительного канала у мелких домашних животных и их диагностическое значение 41

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Карамендин К. О., Саятов М. Х., Кыдырманов А. И., Нуршин К. А., Сулейменова С.
Циркуляция вирусов лейкоза птиц в Казахстане и их ранняя молекулярная диагностика в ПЦР 49

Телегина Е. Ю., Криворучко А. Ю., Скрипкин В. С., Яцык О. А.
Однонуклеотидные замены в гене MYOD1 у овец северокавказской породы 53

ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНАЯ ЭКСПЕРТИЗА

Чугунова Е. О.
Выделение сальмонелл из продуктов, обсемененных *E. Coli* и *Salmonella spp.* 58

СОБЫТИЯ 63

ИНФОРМАЦИЯ 65

Издательство Института Ветеринарной Биологии

Адрес редакции/издателя: 197198, С.-Петербург, ул. Ораниенбаумская, д. 3-Б. Тел. (812) 232-55-92, тел./факс 232-88-61. E-mail: virclin@mail.ru. Сайт: www.invetbio.spb.ru
Подписано в печать 03.06.2017. Дата выхода: 19.06.2017. Отпечатано в типографии ООО «СМДЖИ ПРИНТ»: 197101, Санкт-Петербург, ул. Рентгена, д. 1.
Тираж 1000 экз. Свободная цена. Подписной индекс в каталоге «Газеты. Журналы» – 33184, «Пресса России» – 29447.
Ответственность за достоверность представленных в статьях данных несут авторы. Все рекламируемые товары и услуги имеют соответствующие сертификаты.
За содержание рекламных объявлений редакция ответственности не несет.
© ЧОУДПО «Институт Ветеринарной Биологии», Санкт-Петербург, 2017

The journal is registered by Federal Service for Supervision in the Sphere of Communications, Information Technologies and Mass Communications. The certificate on registration of mass media ПИ № ФС77-36472 of June 3, 2009. The journal is included in the list of the leading peer-reviewed journals and publications of State Commission for Academic Degrees and Titles of the RF Ministry of Education and Science

CONTENTS

Editor-in-Chief

Chuvaev I. V.,
Philosophy Doctor
e-mail: virclin@mail.ru

Computer design Kondrashenkov S.V.

Editorial Board

Aliiev A.A.,
Doctor of Science, Professor

Andreeva N. L.,
Doctor of Science, Professor

Belova L. M.,
Doctor of Science, Professor

Kudryashov A.A.,
Doctor of Science, Professor

Kontsevaya S. U.,
Doctor of Science, Professor

Kuzmin V. A.,
Doctor of Science, Professor

Panin A.N.,
Doctor of Science, Professor,
Member of RAS

Prudnikov V. S.,
Doctor of Science, Professor

Suleymanov S. M.,
Doctor of Science, Professor
RF Honoured Worker of Science

Vasilyev D. B.,
Doctor of Science

Voronin V. N.,
Doctor of Science, Professor

Yashin A. V.,
Doctor of Science, Professor

On the matters of advertisement
please contact
e-mail: virclin@mail.ru

Subscription requests should be
sent to the editorial office by fax
+7 (812) 232-55-92 or e-mail:
invetbio@yandex.ru.
Information tel. +7 (812) 232-55-92

The journal is based in 2009

Founder and Publisher: Private
educational institution additional
professional education Institute
of Veterinary Biology

EMBRIOLOGY

- Belyakov A.A., Fedorova N.N., Kanieva N.A., Grushko M.P.**
The formation of shemaah organ systems (chalcalbunus chalcoides) at 7th stage
of embryonic development 3
- Pirog A.V., Lozhnichenko O.V.**
Features of development of clavia catfish (clariidae)'s pespriatory system
during early ontogenesis stage 7
- Chumasov E.I., Petrova E.S., Korzhevsky D.E.**
Study of the structure of developing epicardium and vaskularization in the heart of newborn rats 12

VIROLOGY

- Doronin M.I., Medvedeva N.N., Guseva M.N., Shishkova A.A., Michalishin D.V.**
The method for determining of concentration of "full" particles of strain "A/KUTI/2013"
of foot-and-mouth disease virus into raw material for vaccine using reverse
transcription-polymerase chain reaction with hybridization-fluorescence detection 19
- Zavyalova E.A., Karpova M.A., Droshnev A.E.**
Solid phase elisa test for diagnostics of viral diseases of salmon fishes 25

EPIZOOTOLOGY

- Suleymanov S.M., Parshin P.A., Pavlenko O.B., Slobodjanik V.I., Klimov N.T.**
Epizootologicheskyy aspects and kliniko-morfologicheskaya diagnosis of diseases of
digestive organs of the bacterial aetiologi at pigs 30

PATHOLOGICAL PHYSIOLOGY

- Ledenev O.A., Lozhnichenko O.V.**
The particular properties of the gastrointestinal tract of the Black Sea fishes 36

DISEASES DIAGNOSTICS

- Tsyganskiy R.A.**
The artifacts during ultrasound screening of small pets' alimentary canal
and their diagnostic value..... 41

MOLECULAR DIAGNOSIS

- Karamendin K.O., Sayatov M.H., Kydyrmanov A.I., Nurshin K.A., Suleymenova S.S.**
Circulation of avian leukosis viruses and their early molecular diagnostics by 49
- Telegina E.Y., Krivoruchko A.Y., Skripkin V.S., Yatsyk O.A.**
Single-nucleotide substitutions in MYOD1 gene of north caucasus breed sheeps 53

VETERINARY-SANITARY EXPERTISE

- Kudriashov A.A., Balabanova V.I., Pudovkin D.N., Belyaeva E.V.**
The isolation of *Salmonella* from products that contaminated
by *E. Coli* and *Salmonella* Spp. 58

EVENTS 63

INFORMATION 65

Publishing of Institute of Veterinary Biology

Address of the editorial office/publisher: 197198, St.-Petersburg, Oranienbaumskaya st., 3-5. Tel. +7 (812) 232-55-92, fax: 232-88-61. E-mail: virclin@mail.ru. Site: invetbio.spb.ru
Signed for press on 03.06.2017. Issue date: 19.06.2017. Printed at printing house SMG Print, Ltd.: 197101, Russia, Saint-Petersburg, Rentgena st., 1. Circ. 1000 pc.
Free price. The subscription index in catalogues: "Gazety. Journaly" ("Newspapers. Magazines") – 33184, "Pressa Rossii" ("Russian Press") – 29447.

The responsibility for reliability of the data presented in the articles is born by authors. Goods and services
advertised in this magazine are properly certified. Editorial staff is not responsible for the content of any advertisements.
© Private educational institution additional professional education Institute of Veterinary Biology, Saint-Petersburg, 2017

УДК 639.371

Ключевые слова: зародыши шемаи, формирование, эмбриональное развитие, нервная система, органы чувств, пищеварительная система, хорда, мезонефрос

Key words: *Shemaah embryos, formation, embryonic development, nervous system, sensory organs, digestive system, chord, mesonephros*

Беляков А. А., Федорова Н. Н., Каниева Н. А., Грушко М. П.

**ФОРМИРОВАНИЕ СИСТЕМ ОРГАНОВ ШЕМАИ (CHALCALBUNUS CHALCOIDES)
НА 7-м ЭТАПЕ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ**
*THE FORMATION OF SHEMAAH ORGAN SYSTEMS (CHALCALBUNUS CHALCOIDES)
AT 7TH STAGE OF EMBRYONIC DEVELOPMENT*

ФГБОУ ВО «Астраханский государственный технический университет»

Адрес: 414056, Россия, г. Астрахань, ул. Татищева, д. 16

Astrakhan State Technical University, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education

Address: 414056, Russia, Astrakhan, Tatishcheva str., 16

Беляков Александр Анатольевич, аспирант каф. гидробиологии и общей экологии.

E-mail: tfemrpt@mail.ru. Тел. +7 918-041-17-80

Belyakov Alexander A., Post-graduate Student of the Dept. of Hydrobiology and General Ecology.

E-mail: femrpt@mail.ru. Tel. +7 918-041-17-80

Федорова Надежда Николаевна, д. м. н., профессор каф. гидробиологии и общей экологии.

E-mail: fedorova37@mail.ru. Тел. +7 902 116-73-29

Fedorova Nadezhda N., Doctor of Medical Science, Professor of the Dept. of Hydrobiology and General Ecology.

E-mail: fedorova37@mail.ru. Tel. +7 902 116-73-29

Каниева Нурия Абдрахимовна, д. б. н., профессор каф. прикладной биологии и микробиологии.

E-mail: kanievana@mail.ru. Тел. +7 906 459-44-35

Kanieva Nuria A., Doctor of Biology Science, Professor of the Dept. of Applied Biology and Microbiology.

E-mail: kanievana@mail.ru. Tel. +7 906 459-44-35

Грушко Мария Павловна, д. б. н., доцент, профессор каф. гидробиологии и общей экологии.

E-mail: mgrushko@mail.ru. Тел. +7 960 853-48-20

Grushko Maria P., Doctor of Biology Science, Associate Professor, Professor of the Dept. of Hydrobiology

and General Ecology. E-mail: mgrushko@mail.ru. Tel. +7 960 853-48-20

Аннотация. У зародышей шемаи в возрасте 44-48 часов после оплодотворения развитие основных систем происходило гетерохромно. На 7-м этапе эмбрионального развития была наиболее дифференцирована нервная система, причем лучше всего был сформирован продолговатый мозг. Из органов чувств у зародышей был сформирован орган зрения, имелись закладки органов слуха и обоняния. Происходило интенсивное развитие сердечно-сосудистой системы: главных камер сердца – предсердия и желудочка. Мезонефрос на 7-м этапе эмбрионального развития функционировал как универсальный кроветворный орган, в его межканальной ткани развивались клетки эритробластического ряда. Стала заметной плавниковая кайма, охватывавшая туловищный и хвостовой отделы зародыша.

Summary. *The development of major systems occurred heterochromically in Shemaah embryos 44-48 hours aged after fertilization. The nervous system was the most differentiated at the 7th stage of embryonic development and besides medulla oblongata was the most formed. The sensory organs of view were formed in embryo body, the sensory organs of hearing and smell were founded. There was an intensive development of the cardiovascular system, the main chambers of the heart, the atrium and the ventricle. The mesonephros at 7th stage of embryonic development functioned as a universal hemopoietic organ, cells of erythroblastic series developed in it's interchannel tissue. Flipper fringe began to be noticeable, it covered trunk and tail sections of the embryo.*

Введение

Благодаря своим высоким пищевым качествам шемая давно привлекала внимание рыбоводов [1, 3–5]. В 1929 г. начал искусственное разведение шемаи рыбовод А. Ф. Ершов на четырех рыбоводных пун-

ктах в бассейне Кубани – реках Псекупсе и Пшише. Уже в 1968–1969 годах было выпущено в Азовское море более 10 млн штук молоди с навеской до 0,1 г. К 1971 году акклиматизация шемаи в низовьях Кубани и Сенгилеевском водохранилище прошла

успешно: шемая стала нереститься в естественной среде [5].

На сегодняшний день в научной литературе сведений о формировании тканей и органов шемаи в эмбриональном развитии представлено достаточно мало [2].

В связи с вышесказанным, целью исследования явился анализ формирования тканей и систем органов шемаи на 7-м этапе эмбрионального развития (44–48 часов после оплодотворения при $T=23-24^{\circ}\text{C}$).

Материалы и методы

Работа выполнена на кафедре гидробиологии и общей экологии Астраханского государственного технического университета в 2015–2016 годах. Основными методами исследования были: ихтиологические (морфологические исследования зародышей шемаи), гистологические (изготовление и анализ серий срезов зародышей шемаи 44–48 часов после оплодотворения), статистические (математическая обработка цифрового материала). Объектом исследования служили зародыши шемаи, возраст которых составлял 44–48 часов после оплодотворения, при выращивании при температуре $23-24^{\circ}\text{C}$ в аппаратах П. С. Ющенко. Сделано 20 фронтальных и сагиттальных серий срезов по общепринятым гистологическим методам. Сбор материала был проведен на Темрюкском рыбободном заводе (Краснодарский край). Длина зародышей – 0,5–0,7 мм, масса – 0,8 мг.

Результаты и обсуждение

Формирование нервной системы на 7-м этапе эмбрионального развития

Зародыш был свернут в клубок вокруг широкой части желточного мешка (рис. 1). На стадии 44–48 часов после оплодотворения спинной мозг зародыша представлял собой полый тяж округлой формы, проходящий вдоль туловищного и хвостового отделов. Сегментарно вдоль спинного мозга располагались спинномозговые узлы (рис. 2).

У зародышей в возрасте 44–48 часов после оплодотворения серое вещество было представлено плотным скоплением нейробластов, белого вещества было очень мало –

едва заметная полоска на периферии спинного мозга.

На изученных стадиях у зародышей наметились все отделы мозга, но самым длинным оказался продолговатый мозг; из всех желудочков мозга наиболее широкой была ромбовидная ямка, особенно нижний ее треугольник. Полость третьего желудочка также напоминала треугольник, но была в три раза меньше ромбовидной ямки. Кроме того, имелась мезенхимальная закладка оболочек мозга и спинномозговых узлов.

Она представляла собой ткань с небольшим количеством клеток и значительным количеством основного аморфного вещества. Полость спинного мозга у зародышей 44–48 часов была овальной в верхней части и округлой – в нижней, в 7 раз уже ромбовидной ямки. Хорда на этих стадиях развития была относительно широкой.

Органы чувств шемаи на 7-м этапе эмбрионального развития

У зародышей в возрасте 44–48 часов после оплодотворения четко выделить все три оболочки глазного яблока не удалось. Имелась общая закладка фиброзной и сосудистой оболочки из молодой соединительной ткани и плотная закладка сетчатки из 3-х рядов нейробластов. В глазном яблоке четко выделялась двухслойная эпителиальная роговица. У хрусталика имелась многоклеточная оболочка из 3–4 слоев округлых клеток с гомогенным центром. Полость глазного яблока, окружавшая хрусталик, была небольшой. Пигментных клеток в глазном яблоке не было (рис. 3).

У зародышей в возрасте 44–48 часов после оплодотворения появились небольшие полые закладки обонятельных ямок и слуховых пузырей.

Развитие пищеварительной системы в эмбриональном периоде (7-й этап)

От уровня верхнего края желточного мешка позадней его стенке опускается зачаток будущего кишечника вдоль всей стенки мешка. Этот зачаток представляет собой трубку с очень незначительной полостью, равномерной на всем протяжении. Стенки зачатка по-

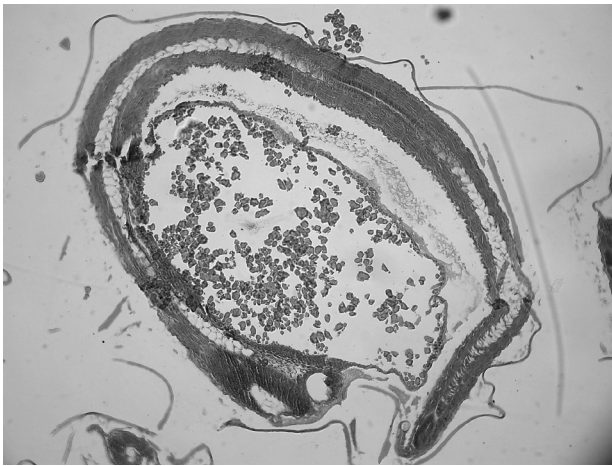


Рис. 1. Зародыш шемаи. Окраска гематоксилин-эозин. Ок. 10. Об. 4.

1. Желточный мешок. 2. Головной отдел.
3. Хвостовой отдел. 4. Хорда.

крыты высоким кубическим эпителием. Причем верхняя часть зачатка начиналась слепо, затем зачаток опускался по широкой части желточного мешка и заканчивался также слепо на уровне каудального конца узкой части желточного мешка. Под головным концом зародыша на верхнепередней части желточного мешка располагался плотный зачаток печеночной ткани (рис. 4). Формировавшаяся печень не имела трабекулярной архитектоники.

Большая часть желтка, находившегося в желточном мешке на 7-м этапе эмбриогенеза, оставалась неиспользованной. У желточного мешка имелись две оболочки: одна, верхняя, – соединительнотканная, под ней располагался кровеносный сосуд; нижняя, или внутренняя, – эпителиальная, из при-

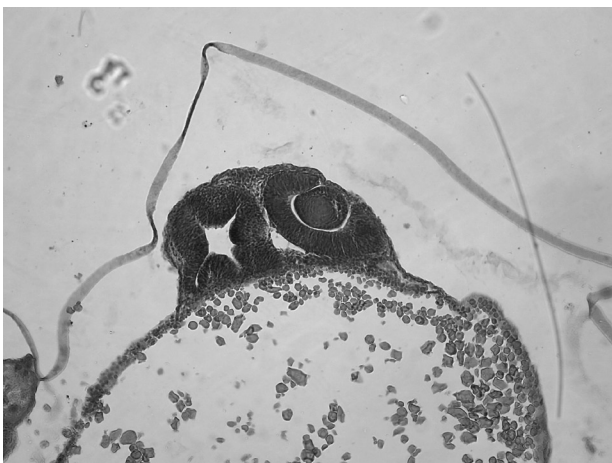


Рис. 3. Фрагмент зародыша шемаи. Окраска гематоксилин-эозин. Ок. 10. Об. 10.

1. Желточный мешок. 2. Глазное яблоко. 3. Поперечный срез спинного мозга.

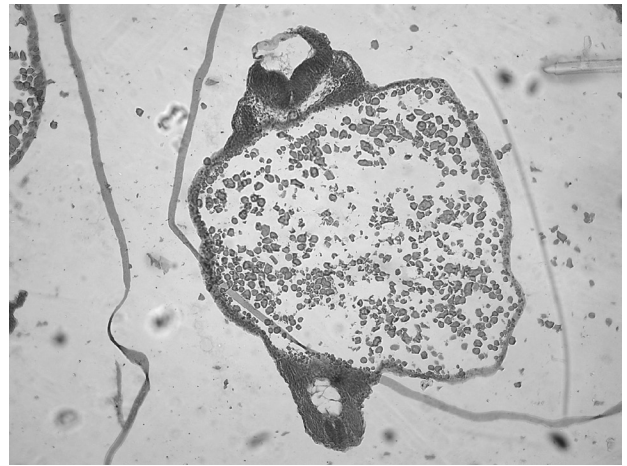


Рис. 2. Фрагмент зародыша шемаи. Окраска гематоксилин-эозин. Ок. 10. Об. 10.

1. Желточный мешок. 2. Спинной мозг. 3. Боковые нервные узлы.

змитических эпителиальных клеток. В полости желточного мешка находились довольно крупные гранулы желтка, более мелкие из них плотно прилегали к эпителиальной оболочке желточного мешка.

Формирование сердечно-сосудистой системы

У зародыша в возрасте 44–48 часов после оплодотворения было обнаружены в сердце две главные камеры – предсердие и желудочек. В брюшной и спинной аорте находились эритробласты.

Развитие мочеполовой системы

Первичная почка у зародышей в возрасте 44–48 часов после оплодотворения пред-

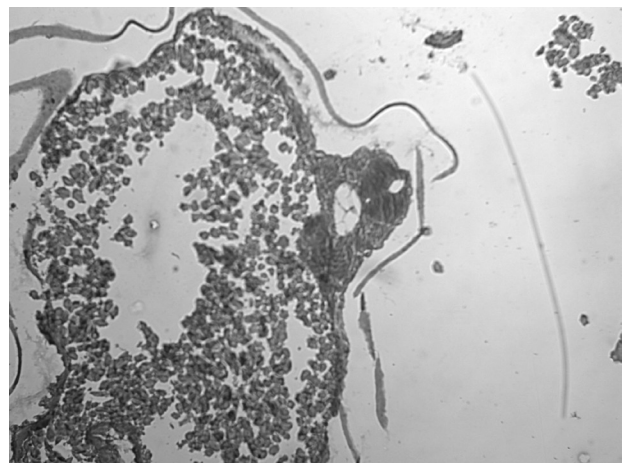


Рис. 4. Фрагмент зародыша шемаи. Окраска гематоксилин-эозин. Ок. 10. Об. 10.

1. Желточный мешок. 2. Спинной мозг. 3. Хорда. 4. Формирующаяся печень.

ставляла собой длинные парные образования, верхний уровень которых находился на середине желточного мешка, а нижний опускался до уровня каудального конца желточного мешка. Вдоль первичной почки опускался слепо начинавшийся мезонефридальный проток. В строме первичной почки находились сегментарно расположенные везикулы, основную массу стромы занимала кроветворная ткань.

Таким образом, как показали проведенные исследования, у зародышей в возрасте 44–48 часов после оплодотворения наиболее сформирован был продолговатый мозг в сравнении с другими отделами головного мозга. В этот же период у зародышей шемаи наиболее быстро формировался орган зрения, и происходило интенсивное развитие сердечно-сосудистой системы: главных камер сердца – предсердия и желудочка.

Кроме того, в связи с формированием мезонефроса, в его межканальной ткани развивались клетки эритробластического ряда.

К 7-му этапу развития стала заметной плавниковая кайма, охватывавшая туловищный и хвостовой отделы зародыша.

Выводы

1. Развитие основных систем зародышей шемаи происходило гетерохромно. При этом на 7-м этапе эмбрионального развития

была наиболее дифференцирована нервная система.

2. Из органов чувств у зародышей на 7-м этапе эмбрионального развития был сформирован орган зрения, хотя имелись закладки органов слуха и обоняния.

3. Мезонефрос на 7-м этапе эмбрионального развития функционировал как универсальный кроветворный орган.

Список литературы

1. Астанин, Л. П., Саманеева, Л. И. Сравнительное изучение плодовитости рыба и шемаи, акклиматизированных в Сенгеевском водохранилище [Текст] / Л. П. Астанин, Л. И. Саманеева // Вопросы ихтиологии, 1968. - Т. 8. - № 4. - С. 646-653.

2. Беляков, А. А., Федорова, Н. Н., Грушко, М. П. Изменения клеток и тканей молоди шемаи (*Chalcalbunus chalcoides*) при искусственном выращивании [Текст] / А. А. Беляков, Н. Н. Федорова, М. П. Глушко // Труды ВНИРО : Аквакультура, 2016. - Т. 162. - С. 139-145.

3. Битехтина, В. А., Карпенко, Г. И., Сафонова, М. В. Концепция воспроизводства шемаи в бассейне Азовского моря [Текст] / В. А. Битехтина, Г. И. Карпенко, М. В. Сафонова // I конгресс ихтиологов России: тезисы докладов. – Астрахань : АГТУ, 1997. - С. 306.

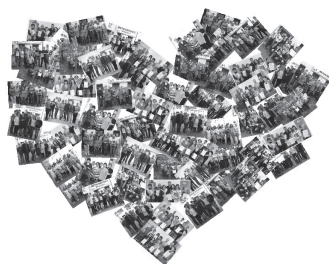
4. Карпенко, Г. И. Экология шемаи *Chalcalbunus chalcoides schischcovi* Dremsky в связи с ее искусственным разведением: дис. ... канд. биол. наук [Текст] / Г. И. Карпенко. – Москва, 1984. – 152 с.

5. Карпенко, Г. И., Швецова, Г. Н., Переверзева, Е. В., Головкин, Г. В. Разведение шемаи в рыбоводных комплексах Азовского бассейна: технологическая инструкция [Текст] / Г. И. Карпенко, Г. Н. Швецова, Е. В. Переверзева, Г. В. Головкин // Ростов-на-Дону : «Медиа-Полис», 2007. - 87с.



ЧОУДПО «ИНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЙ БИОЛОГИИ»
г. Санкт-Петербург

Курсы повышения квалификации



- Основы ультразвуковой диагностики в ветеринарии
- Частная ультразвуковая диагностика в ветеринарии
- Рентгенодиагностика в ветеринарии
- Лабораторная диагностика в ветеринарии
- Основы ветеринарной кардиологии
- Основы эхокардиографии в ветеринарии
- Частная ветеринарная кардиология

Предварительная регистрация обязательна! Справки по тел. (812) 612-13-34 или (812) 232-55-92 доб. 208

График проведения и информация на сайте: www.invetbio.spb.ru/seminars.html

УДК 597.554.4

Ключевые слова: филаменты, жаберные ламеллы, наджаберный орган, гиалиновый хрящ, гиперплазия
 Key words: filaments, gill lamellae, above-geel organ, hyaline cartilage, hyperplasia

Пирог А. В., Ложниченко О. В.

**ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ДЫХАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ КЛАРИЕВЫХ СОМОВ
 (CLARIIDAE) НА РАННИХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА**
*FEATURES OF DEVELOPMENT OF CLAVIA CATFISH (CLARIIDAE)'S
 RESPIRATORY SYSTEM DURING EARLY ONTOGENESIS STAGE*

ФГБОУ ВО «Астраханский государственный технический университет»

Адрес: 414056, Россия, г. Астрахань, ул. Тагищева, д. 16

Astrakhan State Technical University,

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education

Address: 414056, Russia, Astrachan, Tatishcheva str., 16

Пирог Анна Викторовна, аспирант каф. гидробиологии и общей экологии, преподаватель.

E-mail: sofichka.pirog@yandex.ru

Pirog Anna V., Post-Graduate Student of the Dept. of Hydrobiology and General Ecology, Lecturer.

E-mail: sofichka.pirog@yandex.ru

Ложниченко Ольга Владимировна, д. б. н.

Lozhnichenko Olga V., Doctor of Biological Sciences

Аннотация. В настоящее время существует немного работ, касающихся развития дыхательного аппарата клариевых сомов в раннем онтогенезе. До появления сформированных жабр процесс газообмена у зародышей и предличинок рыб осуществляется различными провизорными приспособлениями. Предличинки клариевых сомов после выклева имели I, II, III и IV формирующиеся жаберные дуги, покрытые кубическим эпителием. На 5-е сутки после выклева со стороны четверной жаберной дуги вверх глотки стало образовываться небольшое выпячивание, содержащее в своем завитке небольшую полость – будущую полость наджаберного органа. При дальнейшем развитии наджаберный орган стал развиваться стремительно и стал нести функцию дыхания рыбы кислородом воздуха.

Summary. Now there are not many words concerning the development of respiratory system of clavia catfish during early ontogenesis. Gas exchange of embryos and fish progeny realizes by different temporary mechanisms before appearance of formed gills. Clavia catfish progeny had I, II and IV forming gill arches covered cubical epithelium after piercing. A small protrusion began to form from IV gill arch to upper throat at 5th day after piercing. It contained a small cavity – the future cavity of above-gill organ. Above-gill organ began to function as fish respiratory organ.

Введение

Биологические особенности африканского сома делают его одним из перспективных объектов культивирования в установках замкнутого водоснабжения [5, 6]. Необходимо отметить, что в настоящее время большое научно-практическое значение имеют исследования, посвященные изучению раннего онтогенеза гидробионтов в условиях аквакультуры, что объясняется низкой устойчивостью организма в этот период. Знания особенностей гистогенеза таких жизненно важных систем, как кровеносная, нервная, пищеварительная и дыхательная необходимы для корректировки биотехники выращивания, т.к. имен-

но на критических стадиях развития в раннем онтогенезе наблюдается наибольший процент гибели личинок от имеющихся «скрытых дефектов» [1]. Следует отметить, что клариевого сома можно выращивать при высоких плотностях посадки, но главное его преимущество – это способность дышать кислородом воздуха [2–4]. Вопросы морфо- и гистогенеза органов дыхательной системы у клариевых сомов в эмбриональный и постэмбриональный периоды практически не изучены. На основании вышесказанного, целью данного исследования стал анализ закономерностей развития органов дыхательной системы на ранних этапах онтогенеза.

Материалы и методы

Работа выполнена в Астраханском государственном техническом университете на кафедре гидробиологии и общей экологии в течение 2014–2016 гг.

Объектом исследования служили предличинки клариевого сома 1, 2, 3-х суточные, личинки в возрасте 4–25 дней активного питания. Материал был отобран на базе ООО «РЭНТОП-Агро-5» в условиях УЗВ в Краснодарском крае в весенне-летний период 2013–2014 гг. Собранный материал обрабатывался методами классической гистологии [7]. Предварительно зафиксированные пробы в нейтральном формалине заливали в парафиновые блоки. Для изучения строения органов парафиновые блоки нарезали на стандартном микротоме. Толщина срезов составляла 5–6 микрон. Окрашивали препараты гематоксилин-эозином. Просмотр и фотографии срезов были получены при помощи микроскопа Микмед 6 с цифровой камерой для визуализации и компьютерного анализа.

Результаты исследования и их обсуждение

Основной орган дыхания рыб – это жабры, но помимо дыхательной функции они участвуют в осморегуляции и выделении. После выклева предличинки клариевых сомов имели формирующиеся I, II, III и IV жаберные дуги, покрытые кубическим эпителием. Жаберные дуги располагались в небольшой жаберной полости и сверху были прикрыты развивающейся жаберной крышкой. Следует отметить, что до появления функционирующих жабр процесс газообмена у зародышей и предличинок рыб осуществляется различными провизорными приспособлениями, степень развития которых находится в обратной зависимости от содержания кислорода в воде [8,9].

На 4-е сутки после выклева в строении жаберного аппарата произошли следующие изменения. Так, на гистологических срезах наблюдались четыре жаберные дуги, между которыми имелась жаберная щель. Жаберные дуги сверху были прикрыты жаберной крышкой. В основе жаберных дуг располагался гиалиновый хрящ.

Внутри жаберных дуг имелся тонкий кровеносный сосуд. Жаберные дуги покрывали

жаберные филламенты, состоящие из кровеносного сосуда, покрытого молодой соединительной тканью. На филламентах имелись небольшие жаберные ламеллы, покрытые респираторным эпителием.

На 5-е сутки после выклева началось формирование наджаберного органа (рис. 1). Со стороны четверной жаберной дуги вверх глотки стало образовываться небольшое выпячивание, содержащее в своем завитке небольшую полость – будущую полость наджаберного органа. В строении жабр основу жаберных дуг составлял гиалиновый хрящ и кровеносные сосуды, которые окружала молодая соединительная ткань. На жаберных филламентах имелись небольшие жаберные ламеллы, внутри которых имелся кровеносный сосуд, переполненный форменными элементами крови. Следует отметить, что в этом возрасте в строении жаберного аппарата имелось следующее нарушение – гиперплазия как многослойного, так и респираторного эпителиев. Данное нарушение указывает на неблагоприятные условия содержания личинок.

На 10-е сутки после выклева жаберные дуги содержали сформированные жаберные филламенты. Жаберные дуги были покрыты многослойным эпителием, среди клеток которого встречались слизистые клетки. Основу жаберных дуг составлял молодой гиалиновый хрящ, содержащий крупный кровеносный сосуд (рис. 1). Кровеносный сосуд продолжался в жаберные филламенты и распадался на капилляры, которые составляли основу жаберных ламелл. Жаберная крышка прикрывала жаберные дуги. Её основу составляла молодая соединительная ткань, содержащая кровеносные сосуды. Со всех сторон жаберная крышка была покрыта многослойным эпителием, среди клеток которого присутствовали слизистые клетки. В строении жаберных филламентов и ламелл по-прежнему отмечалась гиперплазия многослойного и респираторного эпителия. Следует отметить, что в этом возрасте наджаберный орган значительно увеличивался в размерах и представлял собой полость, располагающуюся над глоткой, соединяющую левую и правую жаберные полости (рис. 2).

Основу полости сформировавшегося наджаберного органа составляла молодая соедини-

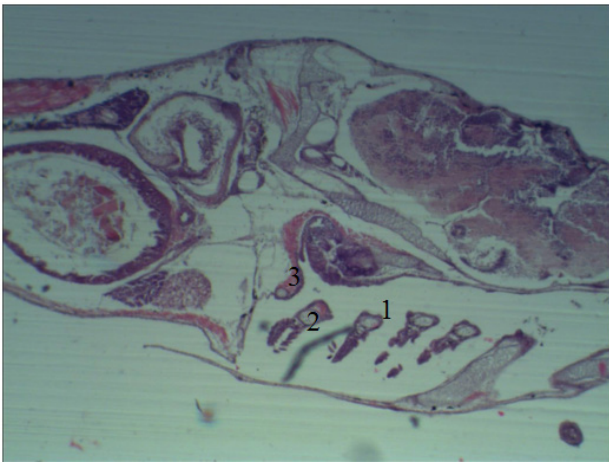


Рис. 1. Фрагменты жаберных дуг предличинки клариевого сома на 5-е сутки после выклева. ОК. 10, ОБ. 10. Гематоксилин-эозин. 1 – жаберные дуги. 2 – гиалиновый хрящ. 3 – формирующийся наджаберный орган.

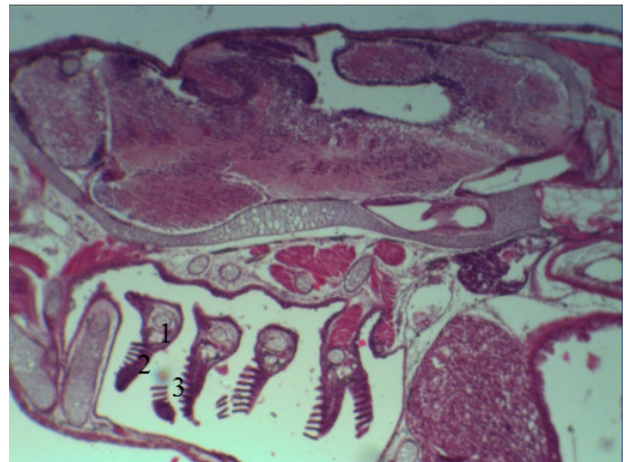


Рис. 2. Фрагменты жаберных дуг предличинки клариевого сома на 10-е сутки после выклева. ОК. 10, ОБ. 10. Гематоксилин-эозин. 1 – жаберные дуги. 2 – жаберные филаменты. 3 – жаберные ламеллы.

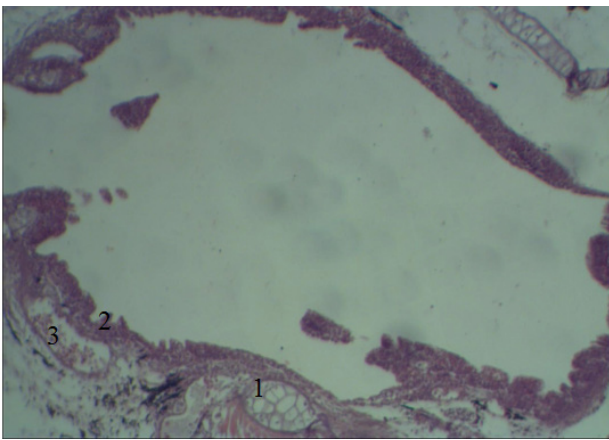


Рис. 3. Фрагмент наджаберного органа на 10-е сутки после выклева. ОК. 10, ОБ. 40. Гематоксилин-эозин. 1 – гиалиновый хрящ. 2 – жаберные ламеллы. 3 – кровеносный сосуд, заполненный клетками крови.

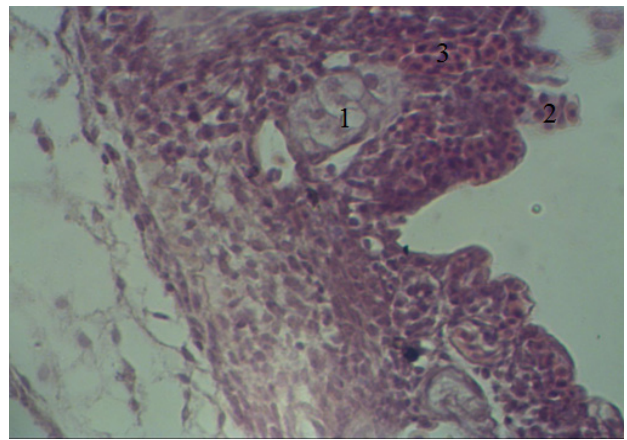


Рис. 4. Фрагмент наджаберного органа на 20-е сутки после выклева. ОК. 10, ОБ. 40. Гематоксилин-эозин. 1 – гиалиновый хрящ. 2 – жаберные ламеллы. 3 – кровеносные капилляры.

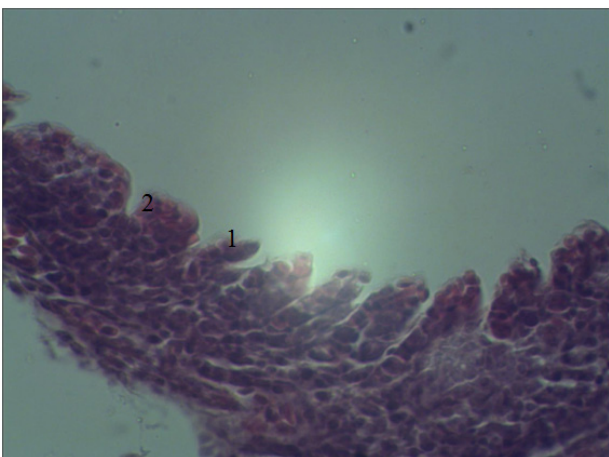


Рис. 5. Фрагмент наджаберного органа на 20-е сутки после выклева. ОК. 10, ОБ. 40. Гематоксилин-эозин. 1 – жаберные ламеллы, расположенные по периметру полости наджаберного органа. 2 – клетки крови.

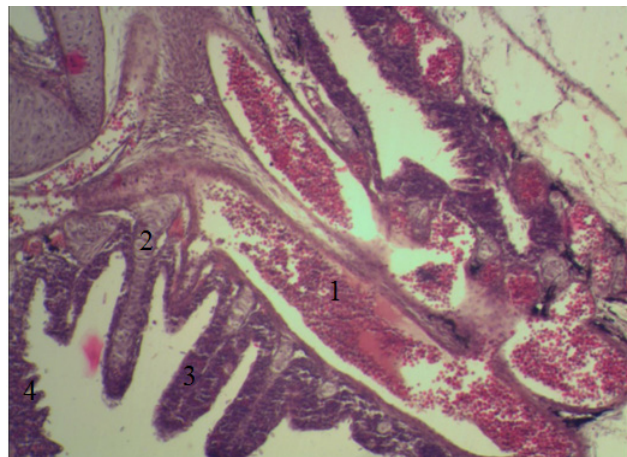


Рис. 6. Фрагмент наджаберного органа на 25-е сутки после выклева. ОК. 10, ОБ. 20. Гематоксилин-эозин. 1 – кровеносные лакуны. 2 – гиалиновый хрящ. 3 – жаберные выросты. 4 – ламеллы.

тельная ткань и крупные кровеносные сосуды. По краям наджаберного органа, в местах соединения его с жаберными полостями, имелись небольшие выросты, в основе которых лежал гиалиновый хрящ, окруженный соединительной тканью. Данные выросты граничили с достаточно крупными кровеносными лакунами, заполненными кровью. По периметру наджаберного органа были кровеносные лакуны разного размера, заполненные форменными элементами крови. Изнутри наджаберный орган был покрыт респираторным эпителием. Кроме того, по всей площади наджаберного органа не часто располагались небольшие выросты, похожие на жаберные ламеллы, в основе которых был кровеносный капилляр.

Таким образом, можно заключить, что к 10-м суткам после выклева у личинок клариевых сомов помимо жаберного аппарата в процессе дыхания участвовал и наджаберный орган.

На 20-е сутки после выклева жаберные дуги были достаточно большие, и в своей основе они были образованы гиалиновым хрящом, окруженным многослойным плоским эпителием, который состоял из нескольких основных типов клеток: респираторных, хлоридных, слизистых, палочковых и недифференцированных. Многослойный эпителий жаберных филламентов сомов лежал на плотной базальной пластинке, которая отграничивала его от кровеносной системы. За гиалиновым хрящом залегали хрящевые основы растущих лепестковых лучей, между которыми проходила жаберная артерия, и находились лепестковые мышцы. Жаберные дуги личинок клариевых сомов были покрыты многослойным плоским эпителием. На дугах располагались жаберные филламенты с ламеллами.

Наджаберный орган продолжил свое развитие. Так, значительно увеличилось количество массивных выростов, в основе которых имелся гиалиновый хрящ. В основании гиалинового хряща располагался кровеносный сосуд, который распадался на капилляры. Данные капилляры образовывали по поверхности выроста подобие жаберных ламелл (рис. 4, 5).

По бокам от крупных выростов располагались мелкие ламеллы, число которых по

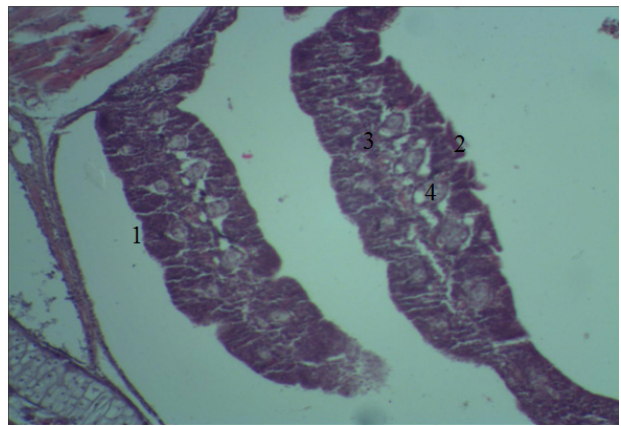


Рис. 7. Фрагмент наджаберного органа на 25-е сутки после выклева. ОК. 10, ОБ. 20. Гематоксин-эозин. 1 – выросты в полость наджаберного органа. 2 – жаберные ламеллы, расположенные по периметру выростов. 3 – клетки крови. 4 – гиалиновый хрящ.

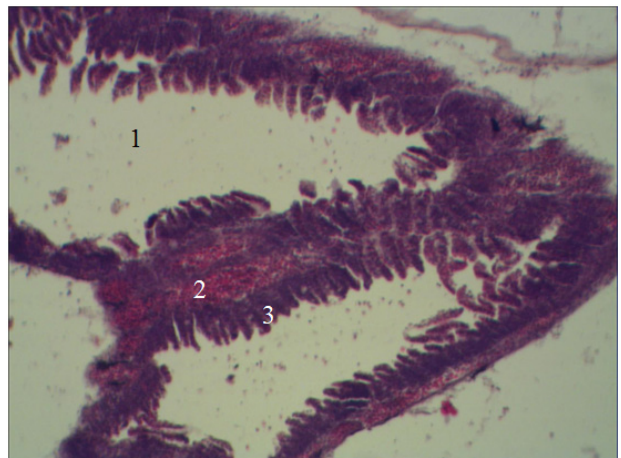


Рис. 8. Фрагмент наджаберного органа на 25-е сутки после выклева. ОК. 10, ОБ. 20. Гематоксин-эозин. 1 – камеры наджаберного органа. 2 – кровь. 3 – ламеллы.

сравнению с 10-ти дневными личинками значительно возросло.

На 25-е сутки после выклева дыхательная система личинок клариевых сомов была представлена активно функционирующим жаберным аппаратом и развивающимся наджаберным органом. Следует отметить, что в этом возрасте у личинок сома на обратной стороне жаберных дуг, обращенных в полость наджаберного органа, были сформированы клиновидные выросты, в основе которых также был гиалиновый хрящ. В основании клиновидного выроста располагалось несколько крупных кровеносных лакун, переполненных кровью (рис. 5, 6). В целом, строение клиновидного выроста было аналогично строению жаберной филламенты, причем на ней уже раз-

личались небольшие формирующиеся ламеллы. От первой и четвертой жаберных дуг жаберная полость продолжалась в заглоточное пространство и переходила в наджаберный орган, который к этому возрасту значительно увеличился в размерах.

Кроме того, в основаниях первой и четвертой жаберных дуг обнаруживалось до пяти крупных жаберных лакун, заполненных кровью. От них по периметру полости наджаберного органа отходили достаточно широкие кровеносные сосуды. В основании каждого выроста наджаберного органа были расположены компактные кровеносные лакуны. Наджаберный орган представлял собой полость, внутрь которой были обращены крупные выросты, содержавшие в своём строении гиалиновый хрящ, в основании которого имелся кровеносный сосуд. От кровеносного сосуда отходили капилляры, которые были покрыты респираторным эпителием (рис. 7).

Некоторые выросты соприкасались и формировали своеобразные камеры наджаберного органа (рис. 8).

Периметр камер наджаберного органа был пронизан мощной кровеносной системой, содержащей огромные лакуны и крупные сосуды, которые были переполнены форменными элементами крови. Внутрь каждой камеры свисали ламеллы, в основании которых проходил кровеносный капилляр.

Заключение

Таким образом, дыхательная системы клариевых сомов включает два органа – жабры и наджаберный орган. Жабры начинают участвовать в газообмене с момента перехода на активное питание. То есть, в возрасте 5-ти суток у клариевых сомов сформирован жаберный аппарат. Зачаток наджаберного органа у личинок сомов впервые наблюдался в возрасте 4-х суток. Принимать участие в газообмене он начал

позже жаберного аппарата – к 10-м суткам после выклева. На 25-е сутки он продолжил формироваться. Возможно, наджаберный орган будет полностью сформирован в мальковом периоде развития.

Список литературы

1. Абдурахманов, Г. М., Зайцев, В. Ф., Ложниченко, О. В., Федорова, Н. Н., Тихонова, Э. Ю., Лепилина, И. Н. Развитие жизненно важных органов осетровых в раннем онтогенезе [Текст] / Г. М. Абдурахманов, В. Ф. Зайцев, О. В. Ложниченко, Н. Н. Федорова, Э. Ю. Тихонова, И. Н. Лепилина // М. : Наука, 2006. – 220 с.
2. Власов, В. А. Воспроизводство и выращивание клариевого сома (*Clarias gariepinus*) в установках с замкнутым водообеспечением (УЗВ) [Текст] / В. А. Власов // Рыбоводство и рыбное хозяйство. – 2012. – № 7. – С. 26-35.
3. Волкова, О. В. Основы гистологической техники [Текст] / О. В. Волкова, Ю. К. Елецкий // М. : Медицина, 1982. – 304 с.
4. Жигин, А. В. Пути интенсификации рыбоводства в замкнутых системах [Текст] / А. В. Жигин // Тезисы докладов «Развитие аквакультуры на внутренних водоёмах». М. : МСХА, 1995. – С. 53–55.
5. Лабенец, А. В., Севрюков, В. Н. Клариевый сом: удачный выбор для индустриального выращивания [Текст] / А. В. Лабенец, В. Н. Севрюков // Материалы международной науч.-практич. конф. «Современное состояние и перспективы развития аквакультуры». Горки, 1999. – С. 32–33.
6. Лепилина, И. Н. Особенности предличиночного развития себрюги в современных экологических условиях : автореф. дисс. ... канд. биол. наук [Текст] / И. Н. Лепилина. – Астрахань, 2000. – 20 с.
7. Мехрдад, Фатгалахи. Весовой и линейный рост американского сома (*Clarias faherpinus burchell*) в зависимости от факторов среды и качества корма [Текст] / Мехрдад Фатгалахи // Рыбоводство и рыбное хозяйство. – 2008. – № 1. – С. 42–54.
8. Подушка, С. Б. Клариевый сом и его использование в рыбоводстве [Текст] / С. Б. Подушка // Рыбоводство и рыбное хозяйство. – 2011. – № 5-6. – С. 61-62.
9. Тихонова, Э. Ю. Формирование жизненно важных органов веслоноса (*Polyodon spathula Walbaum*) в раннем онтогенезе: автореф. дис. канд. биол. наук [Текст] / Э. Ю. Тихонова. – Астрахань, 2003. – 23 с.

УДК 611.11+611.127

Ключевые слова: эпикард, васкулогенез, гладкомышечные клетки, эндотелиоциты, иммуногистохимия
Key words: *epicardium, vasculogenesis, smooth muscle cells, endothelial cells, immunohistochemistry*

Чумасов Е. И.^{1,2}, Петрова Е. С.¹, Коржевский Д. Э.^{1,3}

ИЗУЧЕНИЕ СТРОЕНИЯ РАЗВИВАЮЩЕГОСЯ ЭПИКАРДА И ОСОБЕННОСТЕЙ ВАСКУЛЯРИЗАЦИИ В СЕРДЦЕ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС *STUDY OF THE STRUCTURE OF DEVELOPING EPICARDIUM AND VASKULARIZATION IN THE HEART OF NEWBORN RATS*

¹ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»

Адрес: 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12
*Institute of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Research Institution
Address: 197376, Russia, Saint-Petersburg, Academician Pavlov's str., 12*

²ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»

Адрес: 196084, Россия, Санкт-Петербург, Черниговская ул., 5
*Saint-Petersburg State Academy of Veterinary Medicine,
Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education
Address: 196084, Russia, Saint-Petersburg, Chernigovskaya str., 5*

³Санкт-Петербургский государственный университет

Адрес: 199034, Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9
*Saint Petersburg State University
Address: 199034, Russia, Saint-Petersburg, Universitetskaya quay, 7/9*

Чумасов Евгений Иванович, д. б. н., профессор, ст. н. с. E-mail: iemmorphol@yandex.ru

Chumasov Evgeniy I., Doctor of Biological Science, Professor, Senior Researcher. E-mail: iemmorphol@yandex.ru

Петрова Елена Сергеевна, к. б. н., ст. н. с., ст. н. с.

Petrova Elena S., PhD in Biological Sciences, Senior Researcher

Коржевский Дмитрий Эдуардович, д. м. н., профессор, зав. лабораторией

Korzhevsky Dmitriy E., Doctor of Medical Science, Professor, Head of the Laboratory

Аннотация. Целью работы явилось изучение особенностей строения развивающегося эпикарда и формирующихся кровеносных сосудов сердца крысы в ранний постнатальный период. Работа выполнена на крысах Вистар разного возраста: первого, четырнадцатого и тридцатого дней постнатального развития (n=12). В работе наряду с гистологическими методами (окраска толуидиновым синим и гематоксилином-эозином) использованы иммуногистохимические реакции на альфа-актин – маркер гладкомышечных клеток, актин саркомерный – маркер кардиомиоцитов, фактор Виллебранда – маркер эндотелиоцитов и белок PGP 9.5. Установлено, что в эпителии эпикарда сердца новорожденных крыс содержится белок PGP 9.5. Установлено, что развивающийся эпикард служит источником не только части сосудов, которые объединяются с коронарным руслом, но и даёт начало развитию системы синусоидных капилляров микроциркуляторного русла сердца. Определён клеточный состав клеток в субэпикардальном слое. Показано, что в процессе васкулогенеза из них образуются гладкомышечные клетки, эндотелиоциты и переходные клеточные элементы миофибробластического ряда. В работе дискутируется вопрос об источниках происхождения эндотелиальных клеток в сердце крысы в онтогенезе.

Summary. The aim of the work was to study the features of the structure and differentiation of developing epicardium cells and vaskularization of the heart of newborn rats. The work was performed on Wistar rats of different ages: the first, the fourteenth and the thirtieth days of postnatal development (n = 12). In addition to histological methods (toluidine blue and hematoxylin-eosin dyeing), immunohistochemical reactions to alpha-actin (marker of smooth muscle cells), actin sarcomer (marker of cardiomyocytes), von Willebrand factor (marker of endotheliocytes) and PGP protein 9.5 were used. It was found that there was a protein PGP 9.5 in epithelium of the epicardium of newborn rats. It was established that developing epicardium serves as a source not only parts of a vessels, that divides with coronary channel, but gives rise to the system of sinusoidal capillaries of the microcirculatory channel of the heart, too. The cellular composition of cells in the subepicardial layer was determined. It was shown that at the process of vasculogenesis smooth muscle cells, endothelial cells and transitional cell elements of the myofibroblastic series are formed. The question of sources of origin of endothelial cells in the rat heart during ontogenesis is discussed in the work.

Введение

Известно, что эпителиальный слой эпикарда, покрывающий сердце, происходит из висцерального листка закладки мезодермы (спланхнотомы) и, в частности, является продолжением мезотелия септальной перегородки печени [6, 7, 12–14]. По данным литературы, посвященной эмбриональному развитию сердца, этот эпителий многие называют проэпикардом (ПЭ), так как в эмбриональный период он служит источником прогениторных клеток, участвующих в васкулогенезе коронарных сосудов миокарда, а в постнатальном онтогенезе из него формируется дефинитивный эпикард [6, 9]. Процесс образования коронарных сосудов авторы описывают следующим образом. Начинается он с выселения популяции клеток из эпителия в субэпикардальное пространство на границе с закладкой дифференцирующихся клеток миокарда. Кластеры или группы выселившихся клеток рассматриваются как мезенхимальные элементы, «клетки дериваты эпикарда» (EPDCs), или прогениторные клетки. Эти клетки подвергаются так называемой «эпителиально-мезенхимальной трансформации» (ЭМТ) – процессу, достаточно широко обсуждаемому в последние десятилетия в литературе [3, 8, 10]. В механизмах ЭМТ лежат сложные процессы, в которых участвуют биологически активные вещества, влияющие на пролиферацию кардиомиоцитов, на образование коронарных сосудов и на их рост [5]. Из предшественников ПЭ образуются различные типы клеток, включая эндотелий коронарных сосудов, гладкомышечные клетки (ГМК) и интерстициальные фибробласты миокарда [3, 4, 12, 14]. Следует отметить, что в эмбриогенезе на стадии сердечной трубки и образования «сердечной петли» (E10–E11.5 у мышей) стенка сердца состоит только из двух слоев клеток: наружного – клеток закладки миокарда и внутреннего – эндотелия эндокарда. На более поздней стадии беременности (E16.5 у мыши), включая новорождение, появляется третий слой – проэпикард [3, 4, 12, 14]. Ранние стадии развития ПЭ были изучены на гистологическом, иммуногистохимическом уровнях с помощью сканирующей и конфокальной лазерной микроскопии [10]. Результаты этих современных методов были использова-

ны для подтверждения упомянутой гипотезы (об ЭМТ), идентификации выселяющихся из ПЭ клеток и выяснения их дальнейшей судьбы. Авторы нашли убедительные доказательства того, что у птиц, мышей и крыс выселяющиеся из ПЭ клетки в эмбриогенезе подвергаются ЭМТ, часть из них остается на месте, а часть мигрирует в миокард, где образует сеть коронарных сосудов. Приводится интересный факт – удаление проэпикарда у птиц приводит к задержке как пролиферации кардиомиоцитов, так и развития коронарных сосудов. Несмотря на очевидные и приоритетные данные цитируемых работ, судьба клеток, производных эпикарда, в ранний постнатальный период и их роль в гистогенезе тканей сердца крысы до сих пор остаются недостаточно выясненными.

Цель работы – изучить особенности строения развивающегося эпикарда и формирующихся кровеносных сосудов сердца крысы в ранний постнатальный период.

Материалы и методы

Работа проведена на крысах Вистар разного возраста: первого (P1), четырнадцатого (P14) и тридцатого (P30) дня постнатального развития (n=12). Во всех экспериментах при эвтаназии крыс соблюдали международные правила Хельсинской декларации о гуманном обращении с животными и «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ №775 от 12.08.1977 МЗ СССР). Животных умерщвляли парами этилового эфира, выделяли сердце и околосердечную область и фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [2]. После заливки в парафин изготавливали срезы толщиной 5–7 мкм. Часть срезов окрашивали толуидиновым синим по Нисслю и гематоксилином-эозином. Для иммуногистохимического выявления гладкомышечных (ГМК) клеток использовали мышинные моноклональные антитела к альфа-актину (1A4, Dako, Дания). Для выявления кардиомиоцитов применяли поликлональные кроличьи антитела к саркомерному актину (SpringBioscience, США) в разведении 1:150. Для выявления клеток проэпикарда применяли поликлональные кроличьи антитела к белку PGP 9.5 (1:200, Spring Bioscience, США).

Для идентификации эндотелиальных клеток применяли поликлональные кроличьи антитела к фактору фон Виллебранда (vWF) (Dako, Дания). В качестве вторичных реагентов использовали реактивы из наборов EnVision+SystemLabelledPolymer-HRP Anti-Mouse (Dako, Дания) и Reveal Polyvalent HRP/DAB Delection System kit (Spring Bioscience, США). Для иммуногистохимических реакций использовали отрицательный контроль с нанесением на срезы вместо первичных антител их разбавителя (Dako, Дания).

Результаты исследований

Изготовленные через все сердце крысы первых суток развития (P1) продольные гистологические срезы, окрашенные толуидиновым синим и перечисленными иммуногистохимическими методами (ИГХ), дают представление о топографии, степени зрелости развивающихся тканей и о состоянии васкуляризации. При малом увеличении микроскопа на срезах видно, что если в верхней трети, центральной части миокарда желудочков, на уровне клапанов уже имеются мелкие и среднего диаметра веточки коронарной артерии, то в остальной части желудочка, а также ушек предсердий, артериальные сосуды еще отсутствуют (рис. 1а, 1б). Это свидетельствует о различной степени продолжающихся процессов васкулогенеза в различных отделах сердца новорожденных животных.

Неожиданным оказался факт, что однослойный плоский эпителий ПЭ у крысы P1 содержит пан-нейрональный маркер-белок PGP 9.5. Это позволило не только уточнить строение, но и проследить его взаимоотношение с подлежащим миокардом. Клетки эпителия хорошо окрашиваются этим методом в темно-коричневый цвет, причем ядра интенсивнее, чем цитоплазма (рис. 2а). Выяснилось, что эпителий, не прерываясь, окружает сердце от верхушки вплоть до корней магистральных сосудов. Вокруг органов и крупных сосудов околосердечной области, вне сердца, эпителий не прослеживается. По нашему мнению, его присутствие связано исключительно с близостью миокарда. Описанный эпителий характеризуется различной степенью реактивности и гетерогенностью морфологиче-

ских признаков (различной интенсивностью окраски ядер, объема и толщины цитоплазмы, а также различной интенсивностью деления клеток в зависимости от топографии).

Обращает на себя внимание, что под эпителием, на границе с миокардом, в ушках и в желудочках имеется менее или более выраженное тканевое пространство или субпро-эпикардальный клеточный слой (СПЭС). Особенно хорошо его тканевая структура выражена на границе близко прилежащих друг к другу отделов: аорты, правых ушка и желудочка. В этом расширенном участке различаются мелкие и крупные (от 7 до 15 мм), различной формы (звездчатой, треугольной, веретеновидной), с округлым ядром и небольшим объемом цитоплазмы отростчатые клетки, очень сходные с мезенхимальными элементами. Это - рыхлая соединительная ткань формирующейся адвентиции аорты. По мере удаления от стенки аорты видно, как она постепенно переходит в СПЭС ушка и желудочка и прослеживается в разных участках ПЭ вплоть до верхушки сердца.

Анализ СПЭС и близлежащей области миокарда с помощью гистологических и ИГХ методов показал, что в направлении от эпикарда к миокарду наблюдается развитие кровеносных сосудов (рис. 2). В разных местах миокарда нередко можно видеть митотически делящиеся клетки.

Для морфологической идентификации предшественников различных цитотипов клеток (эндотелиальных, гладкомышечных, фибробластов), участвующих в васкулогенезе и тесных взаимоотношениях с миокардиобластами, оказалось недостаточным использование обычных гистологических методов окраски, и поэтому в работе были использованы иммуногистохимические реакции.

С помощью селективного выявления эндотелиальных клеток с помощью антител к фактору Виллебранда установлено, что процесс образования части сосудов сердца особенно интенсивно происходит в этот срок в СПЭС. Здесь формируются альвеолярные пузырьки или везикуло-тубулярные структуры (рис. 2б). В некоторых участках видно отслоение небольших участков уплощенных клеток от эпителиального пласта путем деламина-

ции. При этом формируются многочисленные сильно уплощенные цистерны или эллипсоидные полости, которые часто встречаются вдоль всего периметра эпикарда, окружающего желудочки сердца. По ширине просвета они составляют от 5 до 25 мкм и длиной от 50 до 300 и более мкм; часть полостей напоминает систему капилляров синусоидного типа. В просвете некоторых из них обнаруживаются эритроциты (рис. 1, 2г, 2д). Многие структуры заполнены белковым содержимым. Состав белкового содержимого цистерн и эллипсоидов, по-видимому, сходен с жидкостью просвета желудочков. Все эти структуры выстланы эндотелиальными клетками с характерными палочковидными ядрами. Многие из них находятся в состоянии митотического деления. В близлежащей области миокарда уже формируются различных типов сосуды, включая артериолы и артерии (рис. 2в).

Для избирательного выявления цитодифференцировки линии ГМК применяли альфа-актин (а-Ак), а для миокардиобластов – актин саркомерный. Отличительные особенности обеих реакций хорошо продемонстрированы на рисунке 3. Установлено, что с помощью первого маркера (а-Ак) выявляются клетки стенок формирующихся сосудов (рис. 3а, 4). Актин саркомерный выявляется в миокардиобластах и миокардиоцитах (рис. 3б).

На рисунках видно, что основным местом образования а-АК⁺ структур в миокарде является СПЭС. В некоторых участках плотность а-АК⁺ клеток была высокой, в то время как в других, ближе в верхушке сердца, значительно меньше. Клетки, содержащие а-АК, окрашиваются селективно в желто-коричневый цвет и имеют различную морфологию: одни из них имеют вытянутую, слегка извитую форму и имеют немногочисленные тонкие отростки, другие представляют собой веретеновидные или треугольные клеточные элементы. Они вместе с клетками, сходными с эндотелиоцитами (а-АК-негативными), образуют однослойные пузырьки или сильно уплощенные цистерны и эллипсоиды, переходящие в синусоидные капилляры. Часть этих клеток определяется в более удаленных от СПЭС участках миокарда, среди миокардиотубул и волокон из миокардиоцитов, где они также участвуют в ва-

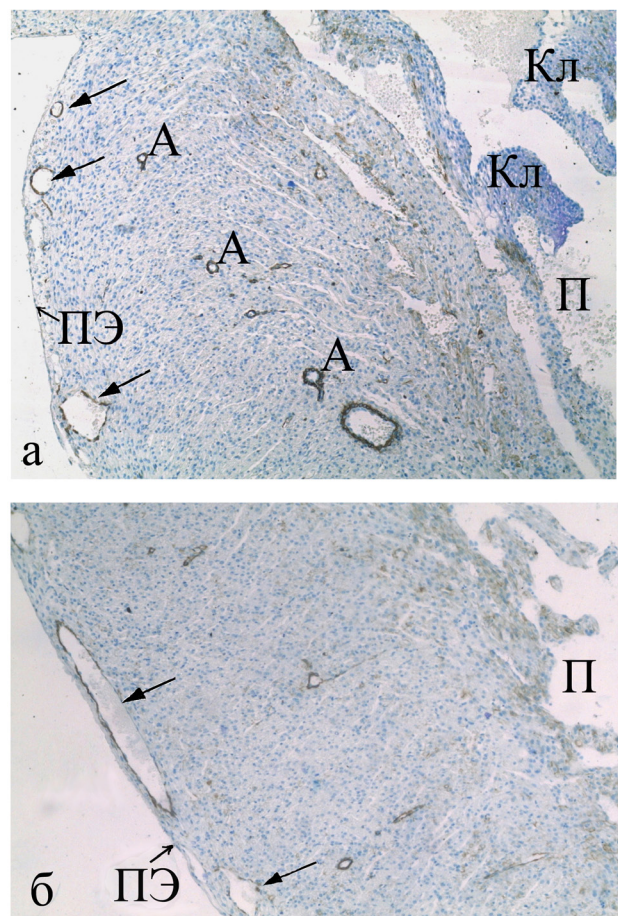


Рис. 1. Стенка правого желудочка новорождённой крысы: а – коронарные сосуды различного диаметра в миокарде проксимального отдела правого желудочка; б – формирующиеся сосуды миокарда в дистальном отделе вблизи верхушки сердца. Стрелки – синусоидные капилляры, Кл – клапан, П – полость желудочка, ПЭ – проэпикард, М – миокард, А – артерия.

скулогенезе. Они встречаются в составе стенок синусоидных сосудов, капилляров и артериальных сосудов и, как правило, находятся в тесной связи с а-АК иммунонегативными клетками миокарда (рис. 2г). У формирующихся капилляров и артериол нередко видны конусы роста (рис. 2в). Стенка некоторых артериол в местах перехода в капилляры имеет эндотелиальные почки или конусы роста. Встречаются а-АК⁺ клетки с сильно уплощенной цитоплазмой. Сравнивая продольные и поперечные срезы, сделанные через ГМК, обнаружено, что продукт реакции а-АК⁺ клеток локализуется в виде кольца по периферии цитоплазмы на некотором удалении от неокрашенного ядра. Данным методом хорошо идентифицируются зрелые миоциты артериол и мелких, и крупных артерий в стенке желудочков. При подкрашивании

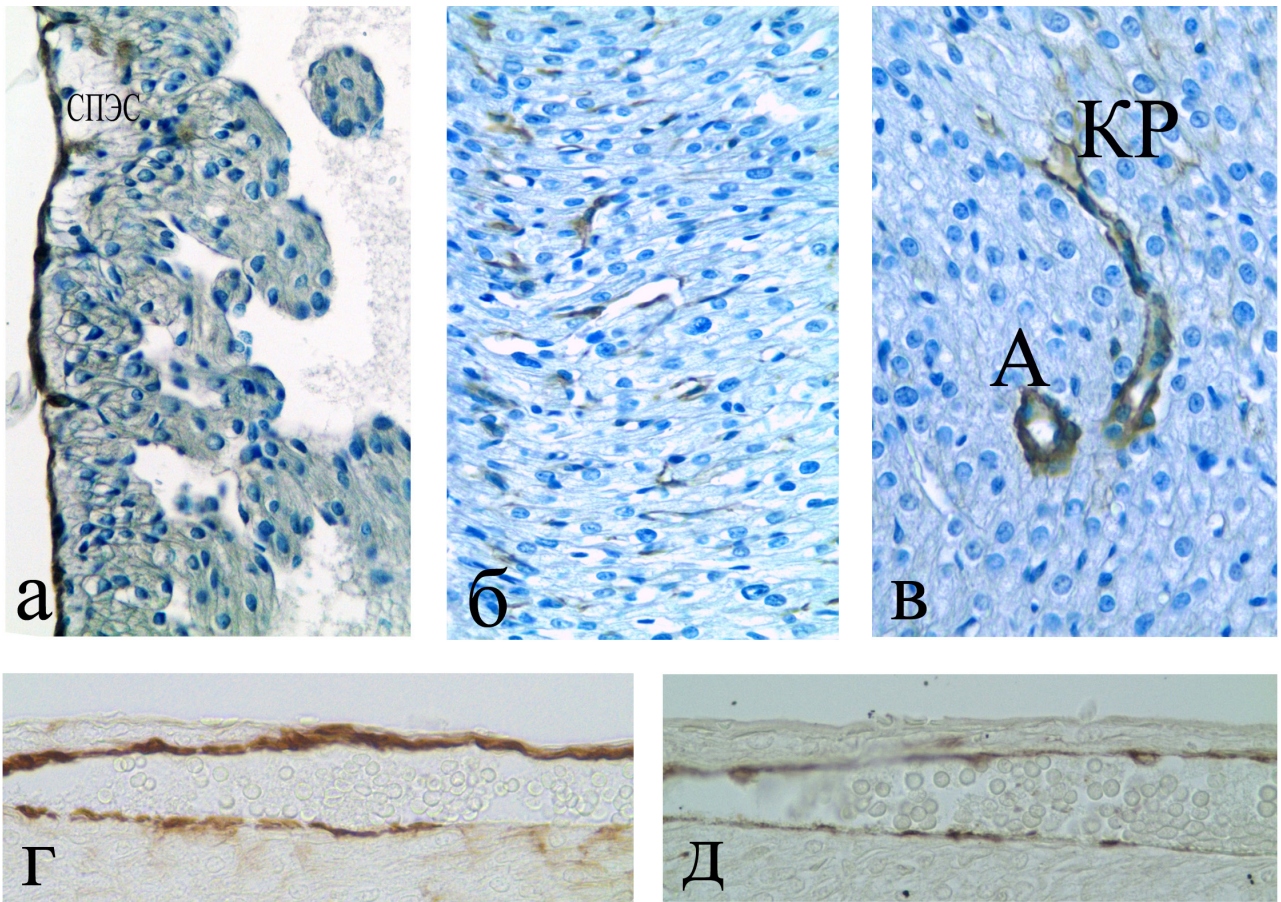


Рис. 2. Иммуногистохимические реакции для определения клеточных элементов в эпикарде и миокарде сердца: а – эпителий развивающегося эпикарда (стрелки); б – формирование синусоидных сосудов в миокарде; в – образование артериол и капилляров; г, д – синусоидный капилляр. СПЭС - субэпикардиальный слой между эпителием и миокардом; КР – конус роста; А – артериола. Иммуногистохимические реакции на белок PGP 9.5 (а), альфа-актин (б, в, г), фактор Виллебранда (д). Ув.: x400.

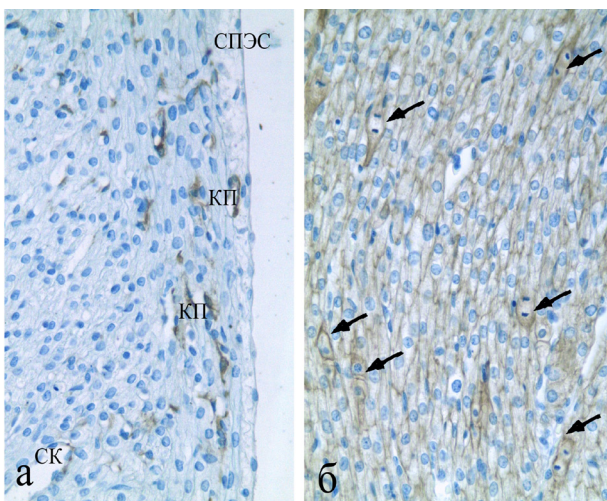


Рис. 3. Периферическая зона миокарда на границе с проэпикардом (а) и центральная часть стенки желудочка (б). СПЭС – субэпикардиальный слой между эпителием и миокардом, КП – синусоидные капилляры, стрелки – митозы в миокардиоцитах. Иммуногистохимическая реакция на альфа-актин (а), на актин саркомерный (б), подкраска толуидиновым синим. Ув.: x 400.

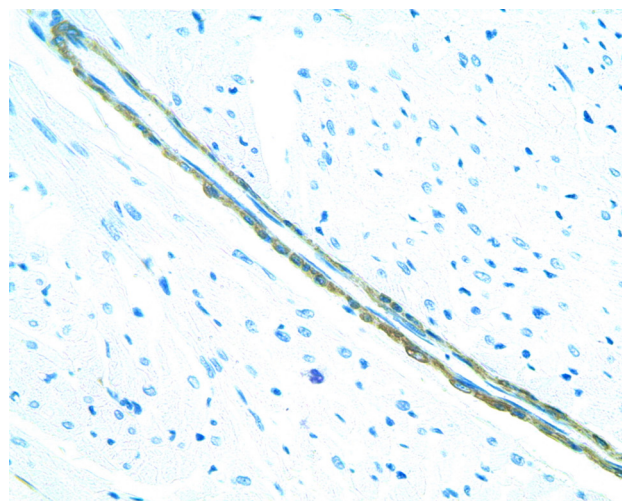


Рис. 4. Образующийся артериальный сосуд (артериола): Э – эндотелиальные клетки, ГМК – гладкомышечные клетки. Иммуногистохимическая реакция на альфа-актин, подкраска толуидиновым синим. Ув.: x400.

срезов толудиновым синим в стенке сосуда четко различается внутренний слой, состоящий из а-АК отрицательных эндотелиоцитов, и наружный слой из а-АК+ ГМК, окрашенных в коричневый цвет (рис. 4).

Использование ИГХ метода выявления саркомерного актина четко продемонстрировало морфологические отличительные особенности между ГМК и миокардиотубулярными структурами миокарда. Показано, что у крысы P1 на данной стадии развития в миокарде, наряду с васкулогенезом желудочков, продолжается интенсивная пролиферация и дифференцировка миокардиобластов (рис. 3б). В различных участках миокарда предсердий и желудочков, в эпикардиальной зоне, в глубоких слоях стенки желудочков, сосочковых мышцах и нитях на этой стадии развития встречаются различной степени дифференцировки мышечные элементы: многочисленные миотубулы без исчерченности, пучки и волокна из цилиндрических миокардиоцитов со слабо выраженной поперечной исчерченностью.

Анализ гистологических препаратов сердца крысы P14 и P30 показал, что в эти сроки наблюдаются существенные изменения по сравнению с предыдущим сроком развития. Эпителий эпикарда утрачивает прежнюю четкость выявления с помощью PGP 9.5, реже встречаются митотически делящиеся клетки. Через 30 суток после рождения у крыс увеличивается объем сердца, появляются соединительнотканые септы, в септах и в миокарде увеличивается численность различного диаметра артериальных сосудов, реже встречаются митотически делящиеся кардиомиобласты.

Обсуждение результатов

В специальной литературе дискутируется вопрос о дифференцировке клеток, выселяющихся из ПЭ в область эпителиально-мезенхимной трансформации (ЭМТ) и выясняется их дальнейшая судьба в процессе миграции в миокард и участие в васкулогенезе [8, 11]. По мнению одних авторов, предшественники ПЭ способны производить все три цитотипа клеток сосудистой стенки: периваскулярные и интермиокардиальные фибробласты, ГМК и эндотелиальные клетки коронарных сосудов [8, 11]. По мнению других [3] – ПЭ служит

общим источником только для ГМК и фибробластов. По их мнению, эндотелиальные предшественники могут находиться не только в новообразованных сосудах субэпикардиального пространства, но и встречаться в удаленных от ПЭ местах миокарда, где также наблюдается васкулогенез. Результаты нашей работы согласуются с данными литературы. Изучив сердце крыс в более поздние сроки развития – в ранний постнатальный период, мы получили данные, подтверждающие высказывания других авторов [8, 11]. При этом полученные нами результаты о гистогенезе эндотелия сосудов миокарда позволяют нам предположить несколько путей или способов его происхождения.

Один путь – прямой, когда выселяющиеся предшественники в виде одиночных клеток образуют пузырьки и трубкообразные структуры. Другой путь – отщепление от общего пласта эпителия эпикарда небольшого слоя клеток, формирующих уплощенные цистерны, эллипсоиды, синусоидные капилляры. Все эти структуры остаются на месте, непосредственно в СПЭС. Третий путь предполагает происхождение эндотелиальных клеток из мигрирующих, коммитированных в эндотелиальном направлении клеток, которые, также как ГМК-элементы, могут давать временно-положительную реакцию на а-Ак. Так как эти клетки находятся в локомоторном состоянии, в их цитоплазме и отростках должно присутствовать достаточно большое количество актиновых филаментов. Подобные клетки нередко выявляются в составе слоя эндотелия синусоидных и обычных капилляров. Через некоторое время они, вероятно, утрачивают способность синтезировать а-Ак+ и дифференцируются в функционально зрелые эндотелиоциты. Следующие за ними популяции клеток, по-нашему мнению, уже дифференцируются в адвентициальные миофибробласты, перициты и ГМК.

Не менее важным источником эндотелия сосудов миокарда на ранних стадиях его развития служит стенка аорты. По данным литературы [1, 3] и собственным наблюдениям, эндотелий эндокарда появляется значительно раньше в эмбриогенезе. Мы также наблюдали в области клапанного аппарата сердца, как эндотелий интимы аорты переходит в эндотелий эндокарда.

По нашим данным, у новорожденных крысят эндотелиальные клетки еще не полностью выстилают просветы полостей ушек и желудочков, они прослеживаются вокруг межпредсердной перегородки, некоторых миокардиальных сосочков и отдельных пучков миокардиоцитов. На основании изложенного можно предположить, что на какой-то, пока точно не установленной, стадии постнатального развития эндотелий системы капилляров, происходящих из ПЭ, объединяется с эндотелием коронарных сосудов аорты. Возможно, проэпикард служит также источником сосудов, которые формируют систему «сосудистых русел» синусоидного типа, связанных непосредственно с кровью желудочков и выполняющих дренажную или депонирующую функции [Афанасьев, Горячина, 2011]. Процесс васкулогенеза в миокарде продолжается и после рождения. Он имеет двухвекторную направленность – сосуды, происходящие из эпикарда, объединяются с сосудами коронарного русла, источником которых является аорта. В результате образуется характерное микроциркуляторное русло миокарда сердца. Это происходит у крысы спустя 2 недели после рождения.

Заключение

В работе исследованы особенности строения развивающегося эпикарда крысы в ранний постнатальный период. Описано строение формирующихся кровеносных сосудов в эпи- и миокарде. Установлена положительная избирательная иммуногистохимическая реакция эпителия развивающегося эпикарда сердца новорожденных крысят к пан-нейрональному маркеру – белку PGP 9.5. Используемые специальные гистологические и иммуногистохимические методы дали возможность проследить межтканевые взаимоотношения в стенке сердца, определить клеточный состав прогениторных клеток в субэпикардальном слое. В процессе васкулогенеза в развивающемся миокарде новорожденных крыс были выявлены переходные клеточные элементы миофибробластического ряда.

Список литературы

1. Афанасьев, Ю. И. Сердечно-сосудистая система. Руководство по гистологии [Текст] / Ю. И. Афанасьев,

В. Г. Горячина // Под ред. Р. К. Данилова. – 2-е изд. – СПб.: СпецЛит. – 2011. – Т. 2. – С. 241-296.

2. Коржевский, Д. Э. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии: руководство [Текст] / Д. Э. Коржевский, О. В. Кирик, Е. С. Петрова, М. Н. Карпенко, П. Григорьев, Е. Г. Сухорукова, Е. А. Колос, А. В. Гиляров // СПб.: СпецЛит. – 2014. – 119 с.

3. Dettman, R. W. Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart [Текст] / R. W. Dettman, W. Denetclaw Jr, C. P. Ordahl, J. Bristow // *Dev. Biol.* – 1998. – Vol. 193. – № 2. – P. 169–81.

4. Kirby, M. L. Molecular embryogenesis of the heart [Текст] // *Pediatr. Dev. Pathol.* – 2002. – Vol. 5. – P. 516–543.

5. Lavine, K. J. Shared circuitry: developmental signaling cascades regulate both embryonic and adult coronary vasculature [Текст] / K. J. Lavine, D. M. Ornitz // *Circ Res.* – 2009. – Vol. 104. – № 2. – P. 159-169.

6. Manner, J., Perez-Pomares, J. M., Macias, D. & Munoz-Chapuli, R. The origin, formation and developmental significance of the epicardium [Текст] / J. Manner, J. M. Perez-Pomares, D. Macias, R. Munoz-Chapuli // *Cells Tissues Organs.* – 2001. – Vol. 169. – № 89. – P. 103.

7. Majesky, M. W. Development of coronary vessels [Текст] / M. W. Majesky // *Curr. Top. Dev. Biol.* – 2004. – Vol. 62. – P. 225-259.

8. Mikawa, T. Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with in growth of the epicardial organ [Текст] / T. Mikawa, R. G. Gourdie // *Dev. Biol.* – 1996. – Vol. 174. – № 2. – P. 221-232.

9. Mikawa, T., Fischman, D. A. Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: discontinuous formation of coronary vessels [Текст] / T. Mikawa, D. A. Fischman // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – Vol. 89. – P. 9504–9508.

10. Nesbitt, T. Epicardial Development in the Rat: A New Perspective [Текст] / N. Nesbitt, A. Lemley A., J. Davis J. // *Microsc. Microanal.* – 2006. – Vol. 12. – P. 390-398.

11. Perez-Pomares, J. M. Contribution of the primitive epicardium to the subepicardial mesenchyme in hamster and chick embryos [Текст] / J. M. Perez-Pomares, D. Macias, L. Garcia-Garrido, R. Munoz-Chapuli // *Dev. Dyn.* – 1997. – Vol. 210. – P. 96-105.

12. Reese, D. E. Development of the coronary vessel system [Текст] / D. E. Reese, T. Mikawa, D. M. Bader // *Circ. Res.* – 2002. – Vol. 91. – P. 761-768.

13. Wada, A. M. Coronary vessel development: a unique form of vasculogenesis [Текст] / A. M. Wada, S. G. Willet, D. Bader // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2003. – Vol. 23. – P. 2138-2145.

14. Wessels, A. The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells [Текст] / A. Wessels, J. M. Perez-Pomares // *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* – 2004. – Vol. 276. – № 1. – P. 43–57.

УДК 619:578.835.2: 616-076

Ключевые слова: вирус ящура, штамм «А/Кути/2013», концентрация «полных» частиц, обратная транскрипция-полимеразная цепная реакция с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

Key words: the foot-and-mouth disease (FMD) virus, strain "A/Kuti/2013", the concentration of "full" particles, reverse transcription-polymerase chain reaction with hybridization-fluorescence detection

Доронин М. И., Медведева Н. Н., Гусева М. Н., Шишкова А. А., Михалишин Д. В.

**СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ «ПОЛНЫХ» ЧАСТИЦ
ШТАММА «А/КУТИ/2013» ВИРУСА ЯЩУРА В СЫРЬЕ ДЛЯ ВАКЦИНЫ
МЕТОДОМ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ-ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ
С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ**

*THE METHOD FOR DETERMINING OF CONCENTRATION OF "FULL" PARTICLES
OF STRAIN "A/KUTI/2013" OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS INTO RAW MATERIAL
FOR VACCINE USING REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION WITH
HYBRIDIZATION-FLUORESCENCE DETECTION*

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»

Адрес: 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец

Federal Centre for Animal Health, Federal Governmental Budgetary Institution

Address: 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets

Доронин М. И., к. б. н., мл. науч. сотрудник. E-mail: doronin@arriah.ru. Тел. (904) 650-34-65.

Doronin M. I., PhD in Biological Sciences, Junior Researcher. E-mail: doronin@arriah.ru. Tel. +7 (904) 650-34-65

Медведева Н. Н., аспирант, биолог. E-mail: medvedeva@arriah.ru

Medvedeva N. N., Post-Graduate Student, Biologist. E-mail: medvedeva@arriah.ru

Гусева М. Н., к. б. н., ст. науч. сотрудник. E-mail: guseva@arriah.ru

Guseva M. N., PhD in Biological Sciences, Senior Researcher. E-mail: guseva@arriah.ru

Шишкова А. А., к. в. н., главный технолог. E-mail: shishkova@arriah.ru

Shishkova A. A., PhD in Veterinary Sciences. E-mail: shishkova@arriah.ru

Михалишин Д. В., к. в. н., зав. лабораторией. E-mail: michalishin_dv@arriah.ru

Michalishin D. V., PhD in Veterinary Sciences, Head of the Laboratory. E-mail: michalishin_dv@arriah.ru

Аннотация. Предложен способ определения концентрации «полных» частиц штамма «А/Кути/2013» вируса ящура в сырье для вакцины методом обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Определена корреляционная зависимость между концентрацией 146S компонента штамма «А/Кути/2013» вируса ящура и пороговым циклом амплификации.

Summary. The method for determining of concentration of "full" particles of strain "A/Kuti/2013" of FMD virus into raw material for vaccines by reverse transcription-polymerase chain reaction with hybridization-fluorescence detection are suggested in the article. The correlation between the concentration 146S component of the "A/Kuti/2013" strain of the foot and mouth disease virus and the threshold amplification cycle was determined.

Введение

Ящур (Aphthae epizooticae) является одним из наиболее опасных, высококонтагиозных и остропротекающих вирусных заболеваний диких и домашних парнокопытных животных, которое наносит большой экономический урон экономике многих стран [5]. Возбудитель ящура относится к порядку Picornavirales, семейству Picornaviridae, роду Aphthovirus [6]. По молекулярно-биологическим свойствам выделяют 7 типов вируса

ящура: О, А, С, Asia-1, SAT-1, SAT-2, SAT-3, большое количество подтипов и множество штаммов [6]. Генетические различия между вирусами возникают в результате спонтанных мутаций в определенных участках генома из-за ошибок вирусной РНК-полимеразы в процессе репликации вирусной РНК. Из всех участков генома максимальной вариабельностью отличается ген VP1, кодирующий основной иммуногенный белок вируса [2]. Типы О, А, С представлены в различ-

ных странах мира. Вирусы ящура типа Asia-1 распространены на территории азиатских стран, Ближнего и Среднего Востока, а типов SAT-1,

SAT-2, SAT-3 – в Африке и на Ближнем Востоке. В процессе репродукции в суспензионной перевиваемой культуре клеток из почки новорожденного сирийского хомяка (ВНК-21/2-17) вирус ящура образует 4 варианта специфических антигенов: 1) «полные» вирионы, или 146S компонент, представленный одной молекулой вирусной РНК и 60-ю копиями полипептида VP1-VP2-VP3-VP4; 2) «пустые» капсиды, или 75S частицы, лишённые РНК и включающие в себя 60 копий полипептида VP1-VP3-VP0; 3) 12S частицы, представленные белками VP1, VP2, VP3; 4) Via-антиген, или 3,8S частицы, являющиеся некапсидным полипептидом VP5 [2, 6].

Мероприятия, направленные на профилактику ящура, предусматривают иммунизацию крупного и мелкого рогатого скота, а также контроль уровня напряженности иммунитета [6]. При изготовлении средств специфической профилактики ящура на территории РФ и в пограничных странах используют преимущественно штаммы типов А, О, Asia-1. Для изготовления противоящурных вакцин в качестве производственных штаммов типа А применяли: «А/Иран/96», «А/Турция/97», «А №1701/Армения/98», «А/Иран/2005», «А/Турция/2006», «А2045/Киргизия/2007» и др. Однако периодически продолжают фиксировать вспышки ящура в тех хозяйствах, в которых проводят иммунизацию с использованием вакцин из указанных штаммов. В связи с этим возникла необходимость получить новый производственный штамм из эпизоотического вируса ящура типа А для обеспечения безопасности территории России и сопредельных государств от этого возбудителя. Указанная задача была решена получением штамма «А/Кути/2013» (2013 г., с. Кути Приаргунского района Забайкальского края) для изготовления биопрепаратов специфической профилактики ящура типа А. По сравнению с известными штаммами «А/Кути/2013» обладает более высокой инфекционной, антигенной и иммуногенной

активностью и позволяет обеспечить высокое накопление «полных» частиц, или 146S компонента, вируса ящура в сырье для вакцины [8].

В процессе производства вакцин сырье каждой партии анализируют на количественное содержание 146S частиц [5]. Концентрацию данного компонента в сырье для вакцины определяют с применением количественного варианта реакции связывания комплемента (РСК). Однако данный метод является достаточно трудоемким, характеризуется большой продолжительностью анализа (не менее 3-х суток) и невозможностью одновременного исследования большого количества проб [1]. В связи с этим актуально предложить новый подход к определению концентрации «полных» частиц вируса ящура в сырье для вакцины на основе обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Данный метод отличается высокой чувствительностью и специфичностью, является более экономичным и экспрессным, что позволяет одновременно исследовать несколько десятков проб сырья и сократить время проведения анализа до 4-х часов [7]. Исходя из этого, актуально применять ПЦР и установить математическую зависимость между содержанием «полных» частиц штамма «А/Кути/2013» вируса ящура и пороговым циклом амплификации (Ct) в виде регрессионной модели. Экспериментальное подтверждение корреляционной зависимости результатов ПЦР и РСК позволит разработать быстрый и экономичный способ определения концентрации 146S компонента штамма «А/Кути/2013» вируса ящура в сырье для вакцины.

Цель исследований – провести апробацию способа определения концентрации «полных» частиц штамма «А/Кути/2013» вируса ящура в сырье для производства вакцины на основе метода ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Материалы и методы

Вирус. В работе применяли образцы сырья для вакцины на основе производственного штамма вируса ящура «А/Кути/2013»,

который депонирован в Коллекции штаммов микроорганизмов (КШМ) ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Реакция связывания комплемента (РСК). Для оценки содержания «полных» частиц вируса ящура (в мкг/см³) применяли количественный вариант РСК, используя антиген вируса ящура, репродуцированный в клеточной линии ВНК-21, а также гипериммунные сыворотки морских свинок штамма «А/Кути/2013» вируса ящура [1].

Выделение РНК вируса ящура из проб сырья для вакцины проводили с использованием набора «РИБО-сорб» («ИнтерЛабСервис», РФ) в соответствии с инструкцией производителя.

Обратная транскрипция-полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией. Индикацию и количественный анализ генома вируса ящура в неинaktivированном материале для вакцины проводили методом ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией. Количества компонентов для реакции, а также временные и температурные параметры термоциклирования, указаны в методических рекомендациях, разработанных в ФГБУ «ВНИИЗЖ» и утвержденных Россельхознадзором [4]. Для проведения анализа применяли систему праймеров OIE*3D-F/OIE*3D-R, а также ДНК-зонд TagMan, меченый красителем карбокси-X-родамином (ROX) (OIE*3D). Отжиг данных структур осуществлялся на высококонсервативный участок 3D-гена вируса ящура [6]. Анализ проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» («Qiagen»). Полученные данные анализировали с помощью компьютерной программы «Rotor-Gene Series Software 1.8.17.5», определяющей величину порогового цикла амплификации, которая обратно пропорциональна концентрации РНК вируса ящура и, соответственно, содержанию «полных» частиц. Геном вируса ящура считается выявленным, если $C_t < 37$. Величину эффективности реакции амплификации (E) рассчитывали по формуле:

$E = (10^{-1/k} - 1) \cdot 100\%$, где k – угловой коэффициент функции линейного уравнения.

Статистическая обработка данных. Данные, полученные в результате анализа, статистически обрабатывали, вычисляя сред-

ние арифметические значения, величины стандартных отклонений пороговых циклов амплификации и концентраций «полных» частиц вируса ящура, а также коэффициент детерминации (R²). Обработку результатов и построение диаграмм проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Office [3].

Результаты исследований и обсуждение

В работе исследовали возможность применения метода ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией для определения концентрации «полных» частиц или 146S компонента штамма «А/Кути/2013» вируса ящура в неинaktivированном сырьевом материале для производства вакцин.

Для установления связи между значениями концентраций «полных» частиц и результатами ПЦР составляли стандартную панель контрольных положительных образцов с содержанием РНК штамма «А/Кути/2013» вируса ящура, эквивалентным следующим концентрациям 146S компонента: 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 5,0, 10,0, 20,0 мкг/см³. В анализе применяли также отрицательный контроль, представляющий собой суспензию клеток линии ВНК-21/2-17, не содержащую геном вирусом ящура. Из каждого полученного разведения положительного образца и от отрицательного контроля отбирали по две пробы: одна проба – для измерения величины C_t методом ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией, вторая проба – для определения содержания 146S частиц (C_{146S}) в РСК. Эксперимент проводили в трех повторениях. По итогам исследования получали выборки параллельно установленных значений концентраций «полных» частиц вакцинного штамма «А/Кути/2013» вируса ящура и пороговых циклов амплификации, сведения о которых продемонстрированы в таблице 1 и на рисунке 1.

Как следует из результатов исследования, представленных в таблице 1 и на рисунке 1, значения пороговых циклов амплификации для всех контрольных разведений 146S компонента штамма «А/Кути/2013» вируса ящура с концентрациями от 0,1 до 20,0 мкг/см³ (по данным

Взаимосвязь результатов измерения концентраций 146S компонента штамма «А/Кути/2013» вируса ящура в РСК и величины порогового цикла амплификации в ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией (n=3)

Краткая характеристика анализируемого образца	Концентрация (С) 146S компонента в РСК, мкг/см ³				Пороговый цикл амплификации в ПЦР			
	C ₁	C ₂	C ₃	C _{cp} (M±m)	C _{t1}	C _{t2}	C _{t3}	C _{tcp} (M±m)
положительные контрольные образцы								
концентрация 146S компонента: 0,1 мкг/см ³	0,20	0,10	0,15	0,15±0,04 (p<0,005)	29,25	29,18	29,15	29,19±0,04 (p<0,001)
0,5 мкг/см ³	0,60	0,58	0,65	0,61±0,03 (p<0,001)	29,10	29,04	29,07	29,07±0,02 (p<0,001)
1,0 мкг/см ³	1,03	1,10	1,15	1,09±0,05 (p<0,001)	28,95	28,90	28,84	28,90±0,04 (p<0,001)
2,0 мкг/см ³	1,95	2,05	2,02	2,01±0,04 (p<0,005)	28,55	28,40	28,49	28,48±0,06 (p<0,001)
4,0 мкг/см ³	4,08	3,90	4,10	4,03±0,09 (p<0,005)	27,78	27,96	27,76	27,83±0,09 (p<0,001)
5,0 мкг/см ³	4,88	5,02	5,06	4,98±0,07 (p<0,005)	27,72	27,63	27,61	27,65±0,05 (p<0,001)
10,0 мкг/см ³	9,92	10,15	10,01	10,02±0,09 (p<0,005)	26,35	26,25	26,28	26,29±0,04 (p<0,001)
20,0 мкг/см ³	19,75	19,94	20,05	19,91±0,12 (p<0,005)	23,52	23,48	23,21	23,40±0,14 (p<0,005)
отрицательный контрольный образец								
отсутствие генома вируса ящура	н/в*	н/в	н/в	н/в	н/о**	н/о	н/о	н/о
вирусодержащие образцы сырья для вакцины								
сырье для сорбированной вакцины против ящура штамма «А/Кути/2013» (образец 1)	1,65	1,54	1,70	1,63±0,07 (p<0,005)	28,67	28,71	28,68	28,69±0,02 (p<0,001)
сырье для сорбированной вакцины против ящура штамма «А/Кути/2013» (образец 2)	1,86	1,80	1,94	1,87±0,06 (p<0,005)	28,57	28,62	28,6	28,60±0,02 (p<0,001)
сырье для сорбированной вакцины против ящура штамма «А/Кути/2013» (образец 3)	1,35	1,46	1,50	1,44±0,06 (p<0,005)	28,76	28,72	28,75	28,74±0,02 (p<0,001)
сырье для эмульсионной вакцины против ящура штамма «А/Кути/2013» (образец 4)	1,26	1,35	1,20	1,27±0,06 (p<0,005)	28,84	28,76	28,78	28,79±0,03 (p<0,001)
сырье для эмульсионной вакцины против ящура штамма «А/Кути/2013» (образец 5)	1,78	1,55	1,65	1,66±0,09 (p<0,005)	28,65	28,75	28,66	28,69±0,05 (p<0,001)
сырье для эмульсионной вакцины против ящура штамма «А/Кути/2013» (образец 6)	1,55	1,59	1,71	1,62±0,07 (p<0,005)	28,68	28,63	28,72	28,68±0,04 (p<0,001)

«*» – 146S компонент вируса ящура не выявлен, «**» – геном вируса ящура не обнаружен.

РСК) находились в диапазоне от 29,19 до 23,40, соответственно. В отрицательном контроле «полные» частицы и геном вируса ящура не были выявлены. На основе полученных данных была установлена линейная математическая зависимость между C_{146S} и C_t в виде регрессионной модели:

$C_{146S} = (-3,439)C_t + 100,270$, представленной линейным графиком на рисунке. Коэффициент детерминации (R^2) для данной зависимости стремился к 1 и составлял 0,997, что подтверждало высокую степень достоверности полученных результатов в ПЦР. Эффективность реакции амплификации (E) имела высокое значение и составляла 95,34%.

На следующем этапе работы проводили апробирование разработанного способа с применением предложенной регрессионной модели для определения концентрации «полных» частиц штамма «А/Кути/2013» вируса ящура в сырье для вакцин. Методом ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией и в РСК исследовали неинaktivированные материалы (образцы № 1, 2, 3) для производства сорбированной вакцины против ящура из штамма «А/Кути/2013». Результаты исследования представлены в таблице, из которой видно, что значение C_t для образца № 1 составило $28,69 \pm 0,02$. В соответствии с разработанной регрессионной моделью значение концентрации 146S компонента в данном образце составило $1,60 \text{ мкг/см}^3$, что не противоречит данным РСК ($1,63 \pm 0,07 \text{ мкг/см}^3$). Значение порогового цикла амплификации для образца № 2 – $28,60 \pm 0,02$. Пользуясь предложенной моделью, было рассчитано содержание 146S частиц в данном образце, соответствующее $1,90 \text{ мкг/см}^3$, что сочетается с результатами РСК ($1,87 \pm 0,06 \text{ мкг/см}^3$). Величина C_t для образца № 3 равна $28,74 \pm 0,02$, следовательно, значение C_{146S} – $1,42 \text{ мкг/см}^3$, что вновь коррелирует с данными РСК ($1,44 \pm 0,06 \text{ мкг/см}^3$).

В дальнейшей работе проводили тестирование неинaktivированных образцов № 4, 5, 6, содержащих штамм «А/Кути/2013» и полученных для изготовления эмульсионной вакцины против ящура типов А, О,

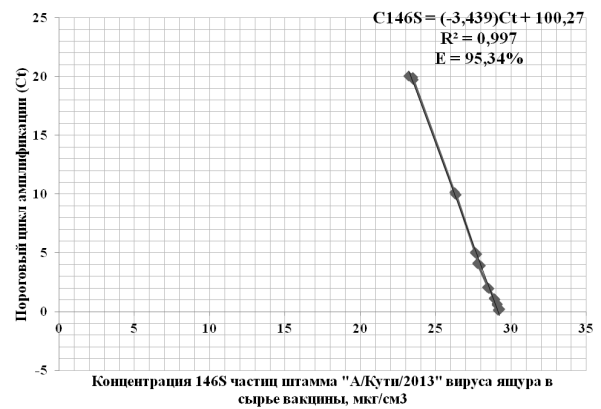


Рис. 1. Калибровочный график зависимости порогового цикла амплификации от концентрации 146S частиц штамма «А/Кути/2013» вируса ящура (n=3)

Asia-1. Результаты анализа отражены в таблице 1, из которой видно, что значение порогового цикла амплификации для образца № 4 – $28,79 \pm 0,03$. В соответствии с предложенной математической моделью концентрация «полных» частиц вируса составила $1,25 \text{ мкг/см}^3$, что сочетается с результатами РСК ($1,27 \pm 0,06 \text{ мкг/см}^3$). При исследовании образца № 5 значение C_t было равно $28,69 \pm 0,05$, следовательно, содержание

146S компонента – $1,60 \text{ мкг/см}^3$, что не противоречит данным РСК ($1,66 \pm 0,09 \text{ мкг/см}^3$). Величина C_t для образца № 6 составила $28,68 \pm 0,04$. Применяя разработанную регрессионную модель, было определено, что содержание 146S частиц вируса ящура равно $1,62 \text{ мкг/см}^3$. Данное значение концентрации сочетается с итогами РСК – $1,62 \pm 0,07 \text{ мкг/см}^3$. Таким образом, разработанная математическая модель с помощью результатов ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией позволяет оценивать содержание «полных» частиц штамма «А/Кути/2013» вируса ящура в сырье для вакцины.

Заключение

Предложен новый способ оценки содержания 146S частиц штамма «А/Кути/2013» вируса ящура в сырье для производства вакцины, применяя ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией и разработанную на его основе математическую модель. По итогам РСК и ПЦР между концентрацией «полных» частиц и поро-

говым циклом амплификации выявлена отрицательная корреляционная зависимость в виде регрессионной модели, представленной графиком линейной функции $C_{146S} = (-3,439)C_t + 100,270$. Предложенный способ дает возможность быстро и с высокой степенью достоверности определять концентрацию «полных» частиц штамма «А/Кути/2013» вируса ящура в сырье для вакцины.

Список литературы

1. Бондаренко, А. Ф. Качественный и количественный иммунохимический анализ вирусных белков [Текст] / А. Ф. Бондаренко // Суздаль, 1994. – 92 с.
2. Вирусные болезни животных [Текст] / В. Н. Сюрин [и др.] // М. : ВНИИТИБП, 1998. – С. 532–548.

3. Гланц, С. Медико-биологическая статистика [Текст] / С. Гланц // Пер. с англ. – М. : Практика, 1999. – 459 с.

4. Методические указания по обнаружению вируса ящура методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. – ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2011 г. – 13 с.

5. Пономарев, А. П. Вирус ящура: структура, биологические и физико-химические свойства [Текст] / А. П. Пономарев, В. Л. Узюмов // Владимир : Фолиант, 2006. – 250 с.

6. OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. – 7th ed. – Paris, 2012. – Vol. 1. – Chap. 2.1.5. – P. 166–169.

7. Wernike, K. Rapid detection of foot-and-mouth disease virus, influenza A virus and classical swine fever virus by high-speed real-time RT-PCR [Текст] / K. Wernike, M. Beer, B. Hoffmann // Journal of Virological Methods. – 2013. – Vol. 193. – № 1. – P. 50–54.

КАК ОФОРМИТЬ ПОДПИСКУ НА ЖУРНАЛ?

А. Через подписной каталог

Индекс в каталоге «Газеты. Журналы» Агентства «Роспечать» – **33184**

Б. Через редакцию журнала

Банковские реквизиты для оплаты подписки по безналичному расчету для юридических лиц:

ЧОУДПО «Институт Ветеринарной Биологии»
ИНН 7802196720 КПП 781301001

Р/с 40703810400000000022 в АО «Горбанк», г. Санкт-Петербург
К/с 30101810200000000814 БИК 044030814

В поле «Назначение платежа» указать:

«Предоплата за подписку на журнал «Актуальные вопросы ветеринарной биологии» на 2017 г. согласно инф. письму б/н от 20.09.16 г. НДС не облагается. Адрес доставки: ...»

Стоимость редакционной подписки на 2017 год:

1600 рублей.

Адрес редакции: Санкт-Петербург, ул. Ораниенбаумская, 3-Б.

Т./ф. (812) 232-55-92, т. 927-55-92.

E-mail: virclin@mail.ru; www.invetbio.spb.ru

УДК 619:616.98:579.843.95:639.3.091

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, болезни лососевых рыб, лабораторная диагностика, инфекционный некроз поджелудочной железы лососёвых, инфекционный некроз гемопоэтической ткани лососевых, вирусная геморрагическая септицемия

Key words: enzyme immunoassay (ELISA), disease of salmon, laboratory diagnosis, salmon infectious pancreatic necrosis (IPN), salmon infectious hematopoietic necrosis (IHN), viral haemorrhagic septicaemia (VHS)

Завьялова Е. А., Карпова М. А., Дрошнев А. Е.

ТВЁРДОФАЗНЫЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ В ДИАГНОСТИКЕ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ

SOLID PHASE ELISA TEST FOR DIAGNOSTICS OF VIRAL DISEASES OF SALMON FISHES

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я. Р. Коваленко»

Адрес: 109428, Россия, Москва, Рязанский проспект, д. 24, к. 1

Russian Research Institute of Experimental Veterinary and Medicine named after Y. R. Kovalenko,

Federal Agency for Scientific Organizations

Address: 109428, Russia, Moscow, Rjazanskij pr., 24, h.1

Завьялова Елена Александровна, к. б. н., зав. лабораторией. E-mail: aquazeda@mail.ru. Тел. (495) 995-88-61

Zavyalova Elena A., PhD in Biological Sciences, Head of the Laboratory.

E-mail: aquazeda@mail.ru. Tel. +7 (495) 995-88-61

Карпова Марианна Алексеевна, мл. науч. сотрудник

Karpova Marianna A., Junior Researcher

Дрошнев Алексей Евгеньевич, к. б. н., ведущий науч. сотрудник. E-mail: asdf1961@mail.ru

Droshnev Aleksey E., PhD in Biological Sciences, Leading Researcher. E-mail: asdf1961@mail.ru

Аннотация. Разработан диагностический набор и способ, позволяющий в течение трёх часов с достоверностью 98 % определять в образцах биологического материала наличие возбудителей вирусных болезней лососевых рыб. В один планшет можно разместить от двух образцов биоматериала в трёх повторениях до 24-х образцов без повторений. Планшет может быть использован весь одновременно или в четыре приёма, для чего использованные ранее ряды высушивают промывателем и заклеивают пленкой или просто помечают маркером. Диагностикум можно использовать в системе мониторинга, проводимого органами ветеринарной службы страны, что позволит контролировать распространение вирусных болезней рыб и сохранить здоровье культивируемых рыб, а также в научных исследованиях для тестирования существующих и новых клеточных линий, в селекционно-племенной работе, для получения информации о закономерностях циркуляции вирусов-возбудителей IPN, IHN и VHS в аквакультуре России и в диких популяциях рыб.

Summary. *The diagnostic set and method were developed, and they allow to determine agents of viral diseases of salmon fishes in samples of biological material with the authenticity of 98 % during three hours. Two samples of biological material can be placed in one tablet in three frequencies up to 24 samples without doubling. The tablet can be used simultaneously as whole or in 4 stages, for this purpose ranges, and for this early used ranks can be dried with the washer and sealed with a film or marked. The diagnostic can be used monitoring system that carried out by veterinary authorities of the country, and this will allows to control the spreading of viral diseases of fishes and to preserve the health of cultivated fishes, as well as in the scientific researches for testing of existing and new cell lines, in the stock breeding, to obtain the information on common factors of the circulation of such agent viruses as IPN, IHN and VHS in the aquaculture of Russia and wildlife populations of fishes.*

Введение

Сельское хозяйство – неотъемлемая часть всей экономики страны, которая обеспечивает сырьем предприятия лёгкой промышленности, а также является главным источником продовольствия. В условиях действующих санкций и обеспечения продовольственной безопасности страны роль сельского хозяйства в современной экономике постоянно возрастает, одной из важнейших отраслей

является аквакультура. По данным ФАО, в общемировом объёме пищевой рыбы на долю выращиваемых биообъектов приходится почти половина, при этом ежегодно увеличивается объём рыболовной продукции. В связи с этим, в процессе культивирования гидробионтов особенно актуальна борьба с инфекционными болезнями. Разнообразие заболеваний оборачивается серьезными экономическими и экологическими проблема-

ми для народного хозяйства. Одна из существенных проблем, сдерживающих развитие отечественной акваиндустрии – вирусные болезни выращиваемых гидробионтов, такие как инфекционный некроз поджелудочной железы лососевых (Infectious pancreatic necrosis, IPN), инфекционный некроз гемопоэтической ткани лососевых (Infectious hematopoietic necrosis, IHN), вирусная геморрагическая септицемия (Viral haemorrhagic septicaemia, VHS) [9, 2].

Сейчас, согласно действующей нормативной документации, диагностика вирусных болезней рыб требует культивирования вируса на клетках, что занимает достаточно длительное время и выполняется только в крупных научно-исследовательских институтах, имеющих профильные лаборатории. Этот метод долгий, а результат анализа напрямую зависит от таких факторов, как опыт и компетенция специалиста, проводящего работу, физиологического состояния и биологических особенностей используемой линии клеток, поэтому применение современных методов, таких как иммуноферментный анализ (ИФА), будет, несомненно, востребовано при диагностике [7, 6, 5]. В отечественной литературе встречаются единичные сообщения об использовании некоторых иммунологических методов в диагностике вирусных болезней рыб [10, 1], однако до настоящего времени широкого распространения они всё же не получили, что может негативно сказываться на качестве ежегодно проводимого мониторинга.

Цель исследований – разработка чувствительного и эффективного способа серодиагностики вирусных болезней лососевых рыб: инфекционного некроза поджелудочной железы (IPN), инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHN), вирусной геморрагической септицемии (VHS) и значительное сокращение времени на постановку диагноза за счёт одновременного исследования образцов биоматериала на три заболевания.

Сведения по использованию комбинированного ИФА и существованию диагностических наборов для выявления вирусных болезней рыб в аналогичном формате в современной литературе отсутствуют. В осно-

ву разработки были положены сведения, полученные ранее сотрудниками лаборатории ихтиопатологии ВИЭВ при создании диагностикумов на основе ИФА для некоторых бактериальных и вирусных инфекций рыб [4, 3]. Однако реальным прототипом является запатентованный способ единовременной серологической диагностики вирусных желудочно-кишечных инфекций крупного рогатого скота – методом иммуноферментного анализа, преимущественно рота-, коронавирусного энтеритов, разработанный в лаборатории желудочно-кишечных болезней КРС ФГБНУ ВИЭВ [8].

Материалы и методы

Вирусы и клетки. В работе использовали очищенные и концентрированные антигены: IPNV штамм N07-1, выращенный на культуре клеток гонады радужной форели OMG (Патент РФ №2495120); IHNV штамм NPK-11 – на культуре клеток FHM; VHSV штамм S7/10 – на культуре клеток эпителиальной папилломы карпов EPC (ЕСАСС №93120820)

Животные. Для получения гипериммунных сывороток к изучаемым антигенам использовали кроликов в возрасте 8–10 месяцев, массой 3–3,5 кг, иммунизацию проводили на опытной базе – Вышневолоцкий филиал ВИЭВ (о. Лисий).

Антитела для сенсibilизации планшетов (антигенсвязывающие) и антигендетектирующие вирусоспецифические кроличьи антитела против IPNV, IHNV, VHSV были получены по разработанным ранее методикам.

Неспецифические компоненты: субстрат – ТМБ (тетраметилбензидин), «стоп-раствор» – 2М серная кислота, отмывочный буфер ФСБ-Т (фосфатно-солевой буфер с твином pH 7.4–7.6).

Выделение IgG из иммунных сывороток проводили путём высаливания раствором сернокислого аммония с последующей гelfильтрацией и ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе с измерением концентрации белка.

Конъюгат специфических антител. Конъюгирование фермента с иммуноглобулинами проводили ковалентным способом, для введения фермента в молекулы антител ис-

пользовали периодат натрия по методике Wilson и Nakane. В качестве ферментативной метки использовалась пероксидаза хрена (ПХ) $RZ > 3,1$.

Результаты исследований

При диагностике вирусных инфекций лососевых рыб важна оперативная информация, во время эпизоотии необходимо анализировать наличие в организме рыб антигена возбудителя для своевременного принятия карантинных мер и профилактических мероприятий.

Использование диагностического набора, включающего все необходимые компоненты для проведения иммуноферментного анализа, позволит выявлять антигены IPN, IHN и VHS одновременно в образцах биологического материала от рыб на ранней стадии развития болезни с высокой специфичностью и чувствительностью. Принцип работы тест-системы заключается в следующем: специфические иммуноглобулины к вирусам-возбудителям IPN, IHN и VHS, иммобилизованные на поверхности лунок одного полистиролового микропланшета, связываются с гомологичными антигенами, если они присутствуют в исследуемом материале, образуя комплекс антиген-антитело. Полученный иммунный комплекс выявляется путём взаимодействия с иммуноферментным конъюгатом, фермент которого после добавления субстрата вызывает разложение субстрат-индикаторного раствора и образование окрашенного продукта. Интенсивность окраски в лунке микропланшета пропорциональна содержанию специфического антигена в испытуемом образце, результаты учитывают по общепринятой формуле.

Диагностический набор для выявления вирусов-возбудителей IPN, IHN и VHS содержит: планшет полистироловый 96-луночный, сенсibilизированный иммуноглобулинами к IPN, IHN и VHS; положительный контрольный образец IPN, инактивированный (IPN K⁺); положительный контрольный образец IHN, инактивированный (IHN K⁺); положительный контрольный образец VHS, инактивированный (VHS K⁺); отрицательный контрольный образец, инактивирован-

ный (K⁻); конъюгат 1, представляющий собой анти-IPN антитела, меченные пероксидазой хрена; конъюгат 2, представляющий собой анти-IHN антитела, меченные пероксидазой хрена; конъюгат 3, представляющий собой анти-VHS антитела, меченные пероксидазой хрена; раствор для разведения конъюгата (PK); промыватель – концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином-80 (ФСБ-Тх25); субстрат – раствор тетраметилбензидина (ТМБ); стоп-реагент; ванночка для реагентов. Компоненты набора расфасованы в пластиковые флаконы разного объёма с завинчивающимися крышками и упакованы в коробки.

Работа проводится в 4 этапа.

1. Подготовка исследуемого материала. Для обнаружения антигенов IPN, IHN и VHS в качестве испытуемого используют биопсийный материал внутренних органов (почка, печень, селезенка), экссудат и/или вирусосодержащую надосадочную жидкость культур клеток. Для получения 10 % суспензии биоматериал гомогенизируют до получения однородной массы на ФСБ (рН=7,2–7,4), полученную суспензию используют для исследования.

2. Подготовка компонентов для постановки реакции. Для промывания планшетов при постановке реакции готовят содержащий твин-80 фосфатно-солевой буфер: размешивают содержимое флакона с ФСБ-Т*25, при выпадении в концентрате осадка прогревают его до полного растворения солей и разводят дистиллированной водой до 700мл. Хранят при 4°C до 5-ти суток.

Растворы конъюгатов 1, 2, 3 в рабочем разведении готовят непосредственно перед использованием, к 0,05 мл концентрированного раствора добавляют 15 мл раствора для разведения конъюгата (PK), тщательно перемешивают.

Раствор ТМБ готов к применению, непосредственно перед использованием отбирают в пластиковую ванночку 12 мл. Остатки раствора ТМБ из ванночки нельзя сливать во флакон с исходным раствором ТМБ. Хранят при 4°C в течение всего срока годности набора.

3. Постановка реакции. Перед началом анализа лунки планшета промывают один

раз промывочным раствором. В каждую лунку вносят по 300 мкл раствора, через пять минут после заполнения лунок раствор аккуратно удаляют. Остатки влаги из лунок тщательно удаляют, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

В первые лунки рядов планшета, сенсублизированных иммуноглобулинами к IPN, IHN и VHS, вносят по 100 мкл специфических положительных антигенов (IPN K⁺, IHN K⁺, VHS K⁺). Во вторые лунки каждого ряда вносят 100 мкл отрицательного антигена. Во все остальные лунки – по 100 мкл исследуемых образцов (желательно делать 2–3 повторения). Лунки на планшете сенсублизированы следующим образом: иммуноглобулинами к IPN (1, 4, 7, 10 ряды), IHN (2,5,8,11 ряды), VHS (3, 6, 9, 12 ряды). Внесение материала в плашку сопровождают тщательным перемешиванием и пипетированием в течение 5–7 секунд. Планшет инкубируют при комнатной температуре (21–25°C) 60 минут.

Растворы конъюгатов № 1, 2, 3 в рабочем разведении готовят за 5–10 минут до окончания инкубации.

По окончании инкубации планшет отмывают четыре раза ФСБ-Т от несвязавшихся антигенов, после чего удаляют влагу, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

В лунки рядов 1, 4, 7, 10 планшета вносят по 100 мкл раствора конъюгата-1 (IPN) в рабочем разведении. В лунки рядов 2, 5, 8, 11 планшета вносят по 100 мкл раствора конъюгата-2 (IHN) в рабочем разведении. В лунки рядов 3, 6, 9, 12 планшета вносят по 100 мкл раствора конъюгата-3 (VHS) в рабочем разведении. Планшет инкубируют при комнатной температуре (21–25°C) 60 минут. По окончании инкубации планшет отмывают четыре раза ФСБ-Т, после чего удаляют влагу постукиванием.

Во все использованные лунки планшета вносят по 100 мкл раствора ТМБ. Для внесения раствора ТМБ используют пластиковую ванночку, входящую в состав набора. Планшет инкубируют при комнатной температуре, в защищённом от света месте, 25–30 минут.

Реакцию заканчивают добавлением во все лунки 100 мкл стоп-реагента.

4. Учёт результатов. Результаты реакции учитывают через 2–3 минуты после добавления стоп-реагента, проводя измерение оптической плотности (ОП) в каждой лунке на спектрофотометре с вертикальным лучом света при длине волны 450 нм или визуально. Результаты исследований учитывают только при соблюдении следующих условий:

– значение ОП в лунке с отрицательным контролем не более 0,30 о.е.;

– значение ОП в лунке с положительным контролем не менее 0,62 о.е.

Реакцию оценивают по формуле и выражают в виде процента реактивности:

процент реактивности (%) = $(\text{ОП} - \text{ОПК}^-) / (\text{ОПК}^+ - \text{ОПК}^-) \times 100 \%$,

где ОП – оптическая плотность образца; ОПK⁺ – оптическая плотность положительного контроля; ОПK⁻ – оптическая плотность отрицательного контроля.

Границы пороговых значений: при величине % > 22 % реакция считается положительной, значение % < 10 % – реакция отрицательная, а диапазон % от 10 % до 22 % – сомнительные результаты реакции.

Выводы

1. Предложенный способ и набор позволяют в течение трёх часов с достоверностью 98 % определять в образцах биологического материала наличие возбудителей наиболее распространённых вирусных болезней лососевых рыб. Формат исследования допускает использование «холодной инкубации» (в течение 4–6 часов при температуре 4°C, в холодильнике), что позволяет получать достоверные, аналогичные результаты в течение одного дня, с перерывом для оператора в ходе работы, что по разным причинам может быть удобно.

2. В один планшет можно разместить от двух образцов биоматериала в трёх повторностях до 24 образцов без повторений. Планшет может быть использован весь одновременно или в четыре приема, для чего использованные ранее ряды высушивают промывателем и заклеивают пленкой либо маркируют.

3. Диагностикум можно использовать в системе мониторинга, проводимого органами ветеринарной службы страны, что позволит контролировать распространение вирусных болезней рыб и сохранить здоровье культивируемых рыб, а также в научных исследованиях для тестирования существующих и новых клеточных линий, в селекционно-племенной работе, для получения информации о закономерностях циркуляции вирусов-возбудителей IPN, IHN и VHS в аквакультуре России и диких популяциях рыб.

Список литературы

1. Доронин, М. И. Выявление антигенов вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых рыб с помощью метода латекс-агглютинации [Текст] / М. И. Доронин, В. А. Пыльнов., Н. А. Назаров, С. С. Рыбаков // Ветеринария. – 2014. – № 9. – С. 56–61.
2. Завьялова, Е. А. Выделение возбудителя вирусной геморрагической септицемии лососевых от рыб в естественных водоемах [Текст] / Е. А. Завьялова, А. Е. Дрошнев, Н. Ю. Кандрина, Н. Р. Калинина // В сборнике международной науч.-практич. конф. «Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп сельскохозяйственных животных, рыб и пчел». – 2011. – С. 75–77.
3. Завьялова, Е. А. Новый метод диагностики йерсениоза лососевых рыб на основе иммуноферментного анализа (ИФА) [Текст] / Е. А. Завьялова, А. Е. Дрошнев., М. А. Карпова, П. Д. Богданова // Сборник материалов 4-й Международной конф. «Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов», г. Борок. – 2015. – С. 144–149.
4. Завьялова, Е. А. Разработка тест-системы для выявления вируса возбудителя инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPNV) иммуноферментным методом [Текст] / Е. А. Завьялова, А. Е. Дрошнев, М. А. Карпова, М. И. Гулюкин // Материалы международной науч.-практич. конф. «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК», Щелково. – 2012. – С. 165–171.
5. Инструкция о мероприятиях по борьбе с вирусной геморрагической септиемией рыб // Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб (часть 1), Москва, отдел маркетинга АМБ-агро. – 1998. – С. 105–113.
6. Инструкция о мероприятиях по профилактике и борьбе с инфекционным некрозом гемопоэтической ткани лососевых рыб // Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб (часть 1), Москва, отдел маркетинга АМБ-агро. – 1998. – С. 87–95.
7. Инструкция о мероприятиях по профилактике и ликвидации инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых рыб // Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб (часть 1), Москва, отдел маркетинга АМБ-агро. – 1998. – С. 96–104.
8. Патент № 2472162 Способ серологической диагностики вирусных желудочно-кишечных инфекций крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа.
9. Пичугина, Т. Д. Выделение вируса инфекционного некроза поджелудочной железы [Текст] / Т. Д. Пичугина, Е. А. Завьялова, М. Н. Борисова, Л. П. Дьяконов, Г. А. Надточей, А. Ф. Шуляк // Ветеринария. – 2005. – № 1. – С. 31–32.
10. Прокаева, И. Б. Разработка непрямого варианта твердофазного иммуноферментного анализа (ТФ ИФА) для диагностики герпесвирусной болезни сибирского осетра [Текст] / И. Б. Прокаева, И. С. Щелкунов // В сборнике «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения». – 2012. – Т. 1. – С. 307–314.



УДК: 619:616.98:578.832./:636.5

Ключевые слова: поросята, гастроэнтериты, бактериальная этиология, гематология, биохимия, иммунология
Keywords: pigs, gastroenteritis, bacterial etiology, hematology, biochemistry, immunology

Сулейманов С. М.¹, Паршин П. А.¹, Павленко О. Б.¹, Слободяник В. И.¹, Климов Н. Т.²

ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ И КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНЕЙ ОРГАНОВ ПИЩЕВАРЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭТИОЛОГИИ У ПОРОСЯТ

*EPIZOOTOLOGICHESKY ASPECTS AND KLINIKO-MORFOLOGICHESKAYA DIAGNOSIS
OF DISEASES OF DIGESTIVE ORGANS OF THE BACTERIAL AETIOLOGY AT PIGS*

¹Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I

Адрес: 394087, Россия, г.Воронеж, ул. Мичурина д. 1
*Voronezh state agrarian university of after emperor Peter I,
Adress; 394036, Russia, Voronezh, Michurin str., 1*

²Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии
фармакологии и терапии Россельхозакадемии

Адрес: 394087 Россия, г. Воронеж, ул. Ломоносова 114 Б
*The All-Russian research veterinary institute of pathology of pharmacology and therapy of the Russian
Agricultural Academy, Voronezh, the Russian Federation.
Adress: 394087, Russia, Voronezh, Lomonosova str 114 B*

Сулейманов Сулейман Мухитдинович – д.в.н., тел. 8(473)2558302, E-mail: suleimanov@List.ru.

Suleymanov Suleyman M. – Doctor of Veterinary Sciences, Professor, tel. 8 (473)2558302, E-mail: suleimanov@List.ru.

Паршин Павел Андреевич – д.в.н., тел. 8(473)2539182, Email: doctor.57@mail.ru.

Parshin Pavel A. - Doctor of Veterinary Sciences, Professortel. 8 (473)2539182, Email: doctor.57@mail.ru.

Ольга Борисовна Павленко – кандидат ветеринарных наук, доцент. тел. 8-906-674-36-02.

Pavlenko Olga B. PhD of veterinary sciences, the associate professor

Слободяник Виктор Иванович – доктор ветеринарных наук, профессор

Viktor I. Slobodjanik - Doctor of Veterinary Sciences, Professor

Климов Николай Тимофеевич – доктор ветеринарных наук, ведущий научный

Klimov Nikolay T. - Doctor of veterinary sciences

Аннотация. Выявлена степень распространения гастроэнтеритов бактериальной этиологии у молодняка свиней путем клинического обследования свинопоголовья и анализа данных ветеринарной отчетности за последние годы. Установлено, что отсутствие надлежащих условий содержания и кормления свиней в комплексах способствует активизации микроорганизмов, осложняющих гастроэнтериты. В возникновении и развитии гастроэнтеритов у поросят участвует преимущественно условно-патогенная микрофлора – эшерихии, энтерококки, сальмонеллы, энтеропатогенные вирусы, реже – микотоксикозы, пастереллы и другие острые инфекционные агенты. Клинически у поросят с отъемом в 26 дней гастроэнтерит проявляется диареей, некоторым угнетением, умеренной жаждой, снижением аппетита на фоне субфебрильной или нормальной температуры тела. У больных поросят с развитием болезни и интоксикации депрессия нарастала до сопорозного и коматозного состояния. При остром течении катарального воспаления в крови поросят, больных гастроэнтеритом, увеличивалось содержание лейкоцитов. В сыворотке крови достоверно снижалась комплементарная активность. Бета-глобулины из белковых фракций в сыворотке крови также достоверно снижались при остром течении гастроэнтерита у поросят. Острый катаральный гастрит, энтерит и колит в слизистой оболочке сопровождалась её неравномерной гиперемией, набуханием и разрыхлением, потерей блеска и складчатостью. Воспаление носило фибринозный, геморрагический, а иногда – гнойно-некротический характер, что было подтверждено гистологическими исследованиями, которые характеризовали форму воспаления и глубину повреждения эпителия, подслизистого слоя и сосудов стенки. При этом наблюдались дистрофические и некробиотические изменения в паренхиматозных органах не только пищеварительной системы, но и в органах сердечно-сосудистой и выделительной систем. Гастроэнтериты преимущественно незаразной этиологии у поросят отмечались в период отъёма с острым катаральным воспалением желудочно-кишечного тракта. Симптоматика и клинико-морфологическая характеристика заболевания позволяют проводить диагностику и дифференциацию гастроэнтеритов поросят от инфекционной патологии.

Summary. Extent of distribution of a gastroenteritis of a bacterial etiology at young growth of pigs by clinical inspection of a pig population and the analysis of data of the veterinary reporting in recent years is taped. It is established that lack of appropriate conditions of keeping and feeding of pigs in complexes promotes activization

of the microorganisms complicating a gastroenteritis. Mainly opportunistic microflora - escherichias, enterococci, salmonellas, enteropathogenic viruses participates in emergence and development of a gastroenteritis in pigs, is more rare - mikotoksikoza, pasterella and other acute infectious agents. Clinically at pigs with depriving in 26 days the gastroenteritis is shown by a diarrhea, some oppression, moderate thirst, a loss of appetite against the background of subfebrile or normal body temperature. At sick pigs with a course of a disease and intoxications the depression accrued to soporous and coma. At an acute current of a catarrh in a blood of the pigs sick with a gastroenteritis, the maintenance of leucocytes was enlarged. In blood serum complementary activity authentically decreased. Beta globulins from protein fractions in blood serum also authentically decreased at an acute current of a gastroenteritis at pigs. Acute catarral gastritis, an enteritis and a colitis in a mucosa were followed by its irregular hyperemia, a swelling and a loosening, loss of gloss and a skladchatost. The inflammation wore fibrinous, hemorrhagic, and sometimes - is purulent - necrotic character that was confirmed with histological researches which characterized a form of an inflammation and depth of damage of an epithelium, submucous layer and vessels of a wall. At the same time dystrophic and necrobiotic changes in parenchymatous organs not only the alimentary system, but also in organs of cardiovascular and secretory systems were observed. Gastroenteritis of mainly noncontagious etiology at pigs became perceptible during depriving with an acute catarrh of digestive tract. The symptomatology and the kliniko-morphological characteristic of a disease allow to carry out diagnostics and differentiation of a gastroenteritis of pigs from infectious pathology.

Введение

Большую роль в их возникновении гастроэнтеритов играют предрасполагающие факторы, а широкое распространение их у поросят обусловлены воздействием многих этиологических факторов и представляют собой сложные биологические процессы, в которых на разных стадиях болезни участвуют вирусы, бактерии, микоплазмы, грибы, простейшие, гельминты, нарушения в обмене веществ и другие. Факторными инфекциями считают такие болезни, которые характеризуются несоответствием взаимодействия между макро- и микроорганизмами и развитием клинических признаков и поражений [2, 6]. Для них характерно то, что возбудители болезней выделяются у здоровых особей и чаще в ассоциации с другими микроорганизмами. Этиологическим агентом факторной болезни является «условно-патогенный» возбудитель, выполняющий роль конечного эффектора болезни, развитие которой определяется разного рода условиями и факторами, вызывающими нарушения физиологических механизмов регуляции, снижение резистентности организма с последующим патогенетическим действием возбудителя с клиническим и патологоанатомическим проявлением болезни [1, 5, 8, 10, 11].

Для своевременной терапии и профилактики гастроэнтеритов у поросят, вызываемых условно-патогенной микрофлорой и другими этиологическими агентами на почве нарушения обмена веществ, гигиены ухода и содержания, а также стресс-факторов,

необходимо проведение своевременной диагностики заболевания.

Материалы и методы

За животными, используемыми в экспериментах, велось ежедневное клиническое наблюдение, учитывалось общее состояние, поведение, аппетит, а в необходимых случаях измерялась температура тела, определялась частота пульса и дыхательных движений. В случае гибели животных проводилось полное патологоанатомическое исследование.

Изучение клинико-морфологической характеристики гастроэнтеритов при остром течении болезни проведено у 241 поросенка в возрасте от 10 до 30 дней, а при хронических гастроэнтеритах – у 203 животных в возрасте 1–2 месяцев. Проведены гематологические и биохимические исследования крови у 43 поросят, больных острым гастроэнтеритом, и у 52 поросят, больных хроническим гастроэнтеритом с соответствующим контролем. Для проведения гистологических исследований был использован материал от 83 поросят. Диагноз на заболевание поросят гастроэнтеритом устанавливался комплексно на основании клинических данных, лабораторных (бактериологических) исследований, патологоанатомического вскрытия с учетом эпизоотической ситуации в хозяйстве. Соблюдались одинаковые условия кормления и содержания поросят в период проведения опытов [3, 4, 7, 9].

В крови и ее сыворотке определялись содержание эритроцитов, лейкоцитов, гемо-

глобина, лизоцима, общего белка, белковых фракций, комплементарной и бактерицидной активности, циркулирующих иммунных комплексов, фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа. Обменные процессы учитывались по уровню молочной кислоты, пировиноградной кислоты, холестерина, содержания глюкозы, общих липидов, триглицеридов, мочевины, креатинина, билирубина, активности АсАТ, АлАТ и щелочной фосфатазы.

Для проведения гистологических и гистохимических исследований образцы паренхиматозных органов и слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта поросят фиксировались в 10,0–12,0% растворе нейтрального формалина и в жидкости Карнуа, обезжоживались в возрастающей концентрации этилового спирта и заливались в парафин. Срезы окрашивались гематоксилин эозином, по Ван-Гизону, тионином по Хейлу, в них выявлялись нейтральные и кислые мукополисахариды, липиды – суданом 3+4, содержание РНП по Браше и Фельгену-Розенбека.

Результаты и их обсуждение

Степень распространения гастроэнтеритов бактериальной этиологии у молодняка свиней проводился путем клинического обследования свинопоголовья и анализа данных ветеринарной отчетности за последние годы. Установлено, что технология ветеринарного обслуживания свинопоголовья комплексов не предусматривает дифференцированного учета гастроэнтеритов, обусловленных бактериальными этиологическими факторами, а также проведение прогностических исследований и учета субклинических форм кишечных бактериозов. В то же время сложившаяся практика выращивания и доращивания молодняка свиней предполагает развитие и широкое распространение гастроэнтеритов, обусловленных условно-патогенной микрофлорой.

Отсутствие надлежащих условий содержания и кормления животных в комплексах также способствовало активизацию микроорганизмов, осложняющих гастроэнтериты. Выяснение этиологической структуры гастроэнтеритов у поросят показало, что

в их возникновении и развитии участвовала преимущественно условно-патогенная микрофлора – эшерихии, энтерококки, сальмонеллы, энтеропатогенные вирусы, реже – микотоксикозы, пастереллы и другие острые инфекционные агенты. У поросят при промышленной технологии выращивания с отъемом в 26 дней гастроэнтерит периода адаптации проявлялся диареей, некоторым угнетением, умеренной жаждой, снижением аппетита на фоне субфебрильной или нормальной температуры тела.

Первичное острое воспаление развивалось быстро. Диффузный фибринозный, геморрагический и гнойный процессы протекали тяжело. При этом температура тела иногда повышалась на 1,0–1,5°C, общее состояние поросят резко ухудшалось, периодически возникал болевой синдром, аппетит снижался или отсутствовал. Неосложненное заболевание при остром течении катарального воспаления слизистой протекало доброкачественно. При тяжелом поражении желудка отмечалась рвота, кал был разжиженный с большим количеством слизи и зловонным запахом. В испражнениях обнаруживались плотные сгустки или крошковатые массы фибрина, толстые пленки или уплотненные сгустки слизи, кровь и гной. У больных поросят с развитием болезни и интоксикации депрессия нарастала до сопорозного и коматозного состояния. При этом отмечалась синюшность слизистых оболочек и кожи в области ушей, пяточка, конечностей. В затянувшихся случаях наступала дегидратация организма.

При остром течении катарального воспаления в крови поросят, больных гастроэнтеритом, увеличивалось содержание лейкоцитов до $15,60 \pm 1,30$ тыс./мм³. Количество палочкоядерных нейтрофилов составляло $12,80 \pm 1,90$ %, а эозинофилов – $5,10 \pm 0,90$ % (таблица 1). В сыворотке крови достоверно снижалась комплементарная активность до $13,60 \pm 1,05$ %, а содержание циркулирующих иммунных комплексов – до 0,17 ед.опт.пл/мл (таблица 2). Бета-глобулины из белковых фракций в сыворотке крови также достоверно снижались при остром течении гастроэнтерита у поросят (таблица 3).

Таблица 1.

**Гематологические изменения в крови одномесячных поросят
при остром течении гастроэнтерита**

Показатели	Группы поросят	
	больные	здоровые
Эритроциты, млн/мм ³	5,60±0,25	5,90±0,46
Лейкоциты, тыс/мм ³	15,60±1,34	9,0±1,31
Гемоглобин, г/л	107,30±8,22	105,70±3,63
Лейкоформула, %		
- нейтрофилы юные	–	–
- нейтрофилы палочкоядерные	12,80±1,90	11,0±1,73
- нейтрофилы сегментоядерные	27,90±1,90	31,20±3,45
- эозинофилы	5,10±0,96	4,0±1,15
- базофилы, %	–	–
- моноциты, %	0,60±0,19	0,80±0,19
- лимфоциты, %	54,40±2,50	53,0±3,45

При вскрытии сосуды брыжейки были инъецированы, лимфоузлы набухшие и гиперемированы. При серозном воспалении желудка отмечалось набухание и гиперемия слизистой оболочки, нередко с кровоизлияниями. Острый катаральный гастрит, энтерит и колит в слизистой оболочке сопровождалась её неравномерной гиперемией, набуханием и разрыхлением, потерей блеска и складчатостью. Воспаление носило фибринозный, геморрагический, а иногда - гнойно-некротический характер. Содержимое желудочно-кишечного тракта преимущественно было жидким, мутноватым, с неприятным запахом, большим количеством слизи, иногда с примесью крови.

Гистологические изменения характеризовали форму воспаления и глубину повреждения эпителия, подслизистого слоя и сосудод стенки. После затухания острого процесса гистологические изменения в желудочно-кишечном тракте поросят выявлялись реже в связи с высокой регенеративной способностью слизистой оболочки.

В тонкой структуре энтероцитов преобладала агранулярная эндоплазматическая сеть с увеличением в ней объёмной доли липидных включений и лизосом. Отмечалась вакуолизация цитоплазмы энтероцитов и матрикса митохондрий. Последние были полиморфными и нередко фрагментировались. Ядра клеток чаще выглядели гиперхромными и пикнотичными.

Таблица 2.

Иммунологические изменения в крови поросят, больных гастроэнтеритом

Показатели	Группы поросят	
	больные	здоровые
Бактерицидная активность	88,20±3,73	90,20±2,44
Комплемент, % гем.	13,60±1,05	21,40±0,99*
Лизоцим, %	10,90±0,94	10,90±1,03
Общие иммуноглобулины, ед. S-H./мл	8,40±0,64	8,50±0,80
Циркулирующие иммунные комплексы, ед. опт. пл/мл	0,17±0,011	0,24±0,02*
Фагоцитарная активность лимфоцитов, %	87,20±3,84	88,0±1,92
Фагоцитарное число, %	11,40±0,92	9,20±0,27
Фагоцитарный индекс, %	13,0±0,49	10,50±0,26

* – P < 0,05

Дистрофические и некробиотические изменения наблюдались в паренхиматозных органах не только пищеварительной системы, но и в органах сердечно-сосудистой и выделительной систем. Например, в почках наблюдались гемодинамические и дистрофические изменения в гломерулярном аппарате и проксимальном нефроне. Отмечался преимущественно серозный гломерулонефрит и дистрофия клеток извитых канальцев.

Заключение

Установлено, что гастроэнтериты у поросят незаразной этиологии, в возникновении и развитии которых участвовала преимущественно условно-патогенная микрофлора, отмечались в период отъёма с острым катаральным воспалением желудочно-кишечного тракта, при этом воспаление слизистой желудка протекало доброкачественно. В крови поросят, больных гастроэнтеритом, увеличивалось содержание лейкоцитов, в сыворотке достоверно снижались: комплементарная активность, содержание циркули-

рующих иммунных комплексов, бета-глобулинов из белковых фракций, следовательно ухудшался транспорт углеводов в организме, что влекло за собой снижение содержания глюкозы в крови.

При патологоанатомическом исследовании было установлено, что слизистая оболочка желудка, тонкого и толстого отдела кишечника была неравномерно гиперемирована, набухшая и разрыхленная, отсутствовал блеск и складчатость. Воспаление носило фибринозный, геморрагический, а иногда – гнойно-некротический характер, что было подтверждено гистологическими исследованиями, которые характеризовали форму воспаления и глубину повреждения эпителия, подслизистого слоя и сосудов стенки. При этом наблюдались дистрофические и некробиотические изменения в паренхиматозных органах не только пищеварительной системы, но и в органах сердечно-сосудистой и выделительной систем.

Таким образом, проведенные исследования позволяют заключить, что симптоматика

Таблица 3.

Биохимические изменения в крови поросят, больных гастроэнтеритом

Показатели	Группа поросят	
	больные	здоровые
Общий белок, г/л	70,20±3,40	71,60±1,70
Альбумины, %	46,50±4,29	49,10±2,98
Альфа-глобулины, %	14,20±2,04	7,90±2,31
Бета-глобулины, %	13,0±1,05	21,30±2,42*
Гамма-глобулины, %	24,60±2,20	21,60±3,42
Глюкоза, мМ/л	3,80±0,14	4,30±0,28
Молочная кислота, мМ/л	1,44±0,07	1,48±0,12
Пировиноградная кислота, мкМ/л	290,10±19,40	297,60±18,40
Общие липиды, г/л	2,50±0,26	3,20±0,46
Холестерин, мМ/л	2,40±0,08	2,80±0,05
Триглицериды, мМ/л	0,90±0,19	0,66±0,18
Билирубин, мкМ/л	2,77±0,20	2,29±0,23
АсАТ, мккат/л	0,37±0,04	0,26±0,03
АлАТ, мккат/л	0,19±0,01	0,23±0,01
Щелочная фосфатаза, ммкат/л	1,19±0,08	1,46±0,17
Мочевина, мМ/л	7,60±0,68	7,80±0,62
Креатинин, мкМ/л	76,80±2,54	80,0±4,44
Фосфор неорганический, мМ/л	1,39±0,08	1,47±0,06
Кальций общий, мМ/л	2,59±0,05	2,47±0,06

* – P < 0,05-0,001

и клинико-морфологическая характеристика заболевания позволяют проводить диагностику и дифференциацию гастроэнтеритов поросят от инфекционной патологии.

Список литературы

1. Агарков А. В. Критерии оценки и прогнозирования жизнеспособности новорожденных животных / А. В. Агарков // Диагностика, лечение и профилактика заболеваний сельскохозяйственных животных : материалы 78 научно-практ. конф. СтГАУ. – Ставрополь, 2014. – С. 11–15.
2. Борисенко С.В. Этиологическая структура желудочно-кишечных болезней поросят в специализированных свиноводческих хозяйствах / С.В. Борисенко [и др.] // Вестник Воронежского государственного аграрного университета. – 2013. – №4. – С. 168–171.
3. Колб В. Г. Справочник о клинической химии / В. Г. Колб, В. С. Камышников. – Минск, 1982. – 366 с.
4. Кондрахин И.П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики : справочник / под ред. И. П. Кондрахина. – Москва : Колос, 2004. – 520 с.
5. Макаров В.В. Эпизоотологическая методология в диагностике, терапии и профилактике инфекцион-

ных, паразитарных и незаразных болезней животных / В.В.Макаров [и др.] // Ветеринарная патология. – 2009.– № 1.– С. 103–111.

6. Паршин П.А. Клинико-морфологическая характеристика, терапия и профилактика гастроэнтеритов молодняка животных : дис. ...докт.ветнаук : 16.00.01 / П.А.Паршин. – Воронеж, 1999. – 289 с.

7. Сулейманов С.М. Клинико-морфологические изменения при гастроэнтеритах у молодняка. / С.М. Сулейманов, П.А. Паршин // Ветеринария. – 2004.– № 2. – С. 42–44.

8. Терехов В.И. Видовой состав бактерий, выделенных от поросят при острых кишечных заболеваниях / В.И. Терехов, А.В. Иванов // Ветеринария Кубани. – 2011. – №3. – С. 23–25.

9. Трояновская Л.П. Основы морфологических методов исследований: учебное пособие / Л.П. Трояновская [и др.]. – Воронеж : ВГАУ, 2015. – 128 с.

10. Шахов А.Г. Факторные инфекции свиней / А.Г. Шахов, А.И. Ануфриев, П.А. Ануфриев // Животноводство России. – 2004. – №4. – С. 14–15.

11. Шахов А.Г. Этиология факторных инфекций животных и меры их профилактики /А.Г. Шахов // Ветеринарная патология. – 2005. – №3. – С. 14.

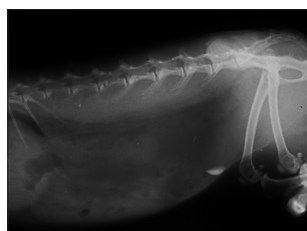


В издательстве Института Ветеринарной Биологии

вышли в свет полноцветные книги:

• **«Ультразвуковое и рентгенологическое исследование брюшной полости мелких домашних животных»**

Автор — Бушарова Елена Владимировна, ведущий ветврач-терапевт, преподаватель курсов повышения квалификации



• **«Патологоанатомическая диагностика болезней собак и кошек»**
(допущено МСХ РФ в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности «Ветеринария»)

Автор — Кудряшов Анатолий Алексеевич, д. в. н., профессор

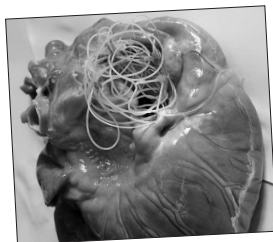


Рис. 75. Дирофиляриоз у собаки.



Рис. 22. Туберкулез у собаки. Жемчужница.

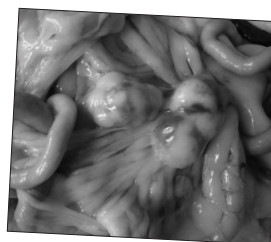


Рис. 109. Лимфома брыжеечных лимфоузлов.

Заказать эти и другие книги по ветеринарии можно
по т. (812) 612-13-34 доб. 208; (812) 232-55-92 доб. 208 или по Email: ivb-info@mail.ru

УДК 597-111:597.442

Ключевые слова: пищеварительный тракт, желудок, средняя кишка, некроз, кровоизлияния

Key words: digestive tract, stomach, midgut, necrosis, hemorrhage

Леденев О. А., Ложниченко О. В.

ОСОБЕННОСТИ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА РЫБ ЧЕРНОГО МОРЯ *THE PARTICULAR PROPERTIES OF THE GASTROINTESTINAL TRACT OF THE BLACK SEA FISHES*

ФГБОУ ВО «Астраханский государственный технический университет»

Адрес: 414056, Россия, г. Астрахань, ул. Тагищева, д. 16

Astrakhan State Technical University,

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education

Address: 414056, Russia, Astrachan, Tatishcheva str., 16

Леденев Олег Анатольевич, аспирант. E-mail: zvp-808@rambler.ru. Тел. +7 988 339-16-23

Ledenev Oleg A., Post-Graduate Student. E-mail: zvp-808@rambler.ru. Tel. +7 988 339-16-23

Ложниченко Ольга Владимировна, д. б. н., доцент, профессор каф. гидробиологии и общей экологии.

E-mail: lojnichenko@rambler.ru. Тел. +7 988 339-60-64

Lozhnichenko Olga V., Doctor of Biological Sciences, Professor of the Dept. of Hydrobiology and General Ecology.

E-mail: lojnichenko@rambler.ru. Tel. +7 988339-60-64

Аннотация. Для оценки физиологического состояния таких видов рыб, как черноморская барабуля, черноморская ставрида, черноморский мерланг, морской ерш, колючий скат использовали особенности гистологического строения желудочно-кишечного тракта, поскольку длительное поступление токсических агентов с пищей приводит к ослаблению защитных свойств организма, и в результате появляются различные патологические изменения в структуре этих органов. В работе описаны морфологические особенности строения желудка и средней кишки. В результате проведенного исследования установлены неспецифические изменения гистоструктуры указанных органов. Все изменения анализируемых органов носили, возможно, адаптационный характер, так как организм рыбы приспосабливался к окружающим экологическим условиям обитания, оптимизируя свою функциональную активность.

Summary. To assess the physiological status of such fish species of the Black Sea as goatfish, Black Sea horse mackerel, Black Sea whiting, sea ruff, spiny ramp were used features of the histological structure of the gastrointestinal tract, because toxic agents that arrive with food can leads to a weakening of the body's protective properties and as a result - there are various pathological changes of this organ's structure. This article describes the structure morphological features of stomach and midgut. The study established nonspecific histological structure of these organs. All changes of analyzed organs were probably adaptation to nature, as the body of fish adapts to the environmental conditions of habitat and optimizes their functional activity.

Введение

В настоящее время вопросы комплексного и рационального освоения биологических ресурсов Черного моря являются достаточно актуальными. В данном водоеме обитают такие виды, как черноморская барабуля, черноморская ставрида, мегланг, морской ерш, шиповатый скат и др., являющиеся объектами как промысловой деятельности, так и объектами любительского лова. Состояние их популяций связано с уникальной структурой бассейна, огромной площадью водосбора, межгосударственной принадлежностью водоема, а также современной экологической обстановкой. Следует указать на то, что по данным различных источников, степень за-

грязненности Черного моря в шельфовых районах по концентрациям нефтепродуктов, фенолов, СПАВ находится выше фонового уровня [1, 2]. Постоянная антропогенная нагрузка оказывает воздействие и на физиологическое состояние рыб. Физиолого-морфологические исследования рыб проводятся в широком масштабе, так как они необходимы для контроля над состоянием популяции и для оценки влияния условий обитания на организм рыб. Кроме того, по мнению ряда ученых, наибольшее отрицательное влияние на экосистемы оказывает непосредственно рыболовство. Достаточно быстрый прогресс в рыбодобывающих технологиях (мощность судов, новые средства навигации, чувстви-

тельные эхолокаторы, высокая эффективность орудий лова и т.д.), избирательность изъятия, невозможность контроля выловов и приловов изменили свойства промысловых экосистем [5, 6]. В настоящее время интенсивность рыболовства в Черном море достаточно низкая, что связано с небольшими запасами рыб и с невысокой рыбопродуктивностью бассейна. Так, на основании анализа результатов рыбопромысловой деятельности пользователей водных биоресурсов Краснодарского края, в 2014–2015 годах в уловах 67,95 % рыб составила барабуля, 26,1 % – ставрида, 5,2 % – скат, 0,5 % – мерланг и 0,25 % – скорпена.

Целью работы явилась оценка состояния желудочно-кишечного тракта половозрелых особей черноморской барабули, черноморской ставриды, мегланга, морского ерша и шиповатого ската на основании гистологического анализа. Для достижения цели были поставлены следующие задачи: оценить физиологическое состояние промысловых видов рыб на основании особенностей гистологического строения желудка и средней кишки; выявить основные патоморфологические нарушения в строении желудка и средней кишки.

Материалы и методы

Работа выполнена на базе кафедры рыбоводства и рыболовства ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный технический университет». Исследовались ткани желудка и средней кишки черноморской барабули (*Mullus barbatus* L., 1758), черноморской ставриды (*Trachurus mediterraneus* Steindachner, 1868), черноморского мерланга (*Merlangius merlangus* L., 1758), шиповатого ската (*Raja clavata* L., 1758) и скорпены (*Scorpaena porcus* L., 1758), выловленных в районе рыбопромыслового участка «Анапская бухта» в 2014–2015 годах. Материал обрабатывался методами классической гистологии [3]. Просмотр и фотографирование препаратов производили при помощи микроскопа Микмед 6 с цифровой камерой для визуализации и компьютерного анализа. Оценку степени патологических изменений в органах и тканях, а также их диагностику

осуществляли в соответствии с методикой Л. А. Лесникова и И. Д. Чинаревой (1987) [4].

Результаты исследования

Гистологическое строение желудка рыб было одинаково. Он состоял из трех оболочек: слизистой, мышечной и серозной. Слизистая оболочка желудка, как правило, образовывала высокие и низкие, плоские складки, покрытые призматическим эпителием, с ядрами, расположенными в базальной части клеток. Желудочные ямки были покрыты призматическим эпителием. Следует отметить, что у ската, мерланга и морского ерша слизистая оболочка была гиперемирована, отмечались участки слущивания эпителиальных клеток. В собственной пластинке слизистой оболочки располагались многочисленные желудочные железы, просвет которых был достаточно узким, плохо различимым в результате отека слизистой оболочки. Границы клеток желудочных желез были неопределяемы. На гистологических препаратах желудка мерланга практически 80 % желез были отслоены от базальной мембраны, причем часть клеток имела пикнотичные ядра. Кроме того, у 18 % исследованных мерлангов и 12 % морских ершей наблюдались участки некроза эпителиального слоя слизистой оболочки (рис. 1).

Анализ гистологических препаратов желудка черноморской ставриды и черноморской барабули показал, что снаружи желудок покрыт тонкой серозной оболочкой, изнутри – широкой, мощной слизистой оболочкой, между которыми расположен узкий мышечный слой. Слизистая оболочка желудка была выстлана однослойным цилиндрическим эпителием и содержала большое количество желез. Следует отметить, что у этих видов рыб железа были заполнена гранулоподобным секретом. Архитектоника слизистой оболочки желудка была схожа с другими исследуемыми видами рыб. Слизистая оболочка образовывала продольные широкие складки, поверхность складок была ровной. Между складками находились достаточно узкие углубления – желудочные ямки, на дне которых открывалось по одной желудочной

железе. Следует отметить, что поверхность желудочных складок и ямок также выстилал призматический эпителий с расположенным в базальной части клетки ядром. В самих желудочных железах клетки были большие, кубической формы, с крупным, отчетливо видимым, шарообразным ядром, лежащим, как правило, в центре клетки.

Под эпителием, между желудочными ямками и железами, располагалась рыхлая волокнистая неоформленная соединительная ткань собственной пластинки слизистой оболочки, переходившая без четких границ в подслизистую основу, которая примыкала к мышечной оболочке. Мышечная оболочка желудка состояла из гладкомышечных клеток. Тонкая серозная оболочка состояла из пластинки рыхлой волокнистой соединительной ткани, покрытой однослойным призматическим эпителием. Следует указать на то, что, только 2,1 % исследованных ставриды и 0,8 % барабули имели некротические участки в слизистой оболочке желудка. Отслоение клеток эпителия от базальной мембраны встречались в 1,6 % случаев у черноморской ставриды и отсутствовали у черноморской барабули (рис. 2).

В результате гистопатологического исследования желудка были выявлены следующие значительные нарушения строения у ската, скорпены и мерланга, проявляющиеся в отеке слизистой оболочки, ее некрозе. Таким образом, на основании выявленных патологических изменений в строении желудка можно заключить, что черноморская ставрида и черноморская барабуля имели средний балл по 2,0, мерланг – 3,4, черноморский ерш и шиповатый скат по 2,1, соответственно.

Гистологический анализ средней кишки исследованных рыб показал, что у всех изучаемых рыб она была устроена одинаково и включала в себя слизистую, мышечную и серозную оболочки. Слизистая оболочка состояла из эпителия, собственной пластинки слизистой оболочки, переходящей в подслизистую основу. Средняя кишка, благодаря наличию ворсинок и крипт, имела характерный рельеф. На гистологических препаратах крипты были приблизительно одинаковой глубины, тесно прилегали друг к другу и располагались в собственной пластинке

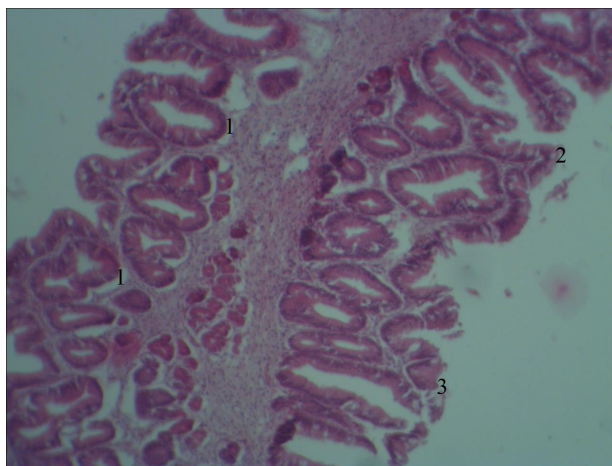


Рис. 1. Фрагмент желудка морского ерша. ОК. 10, ОБ. 40. Гематоксилин-эозин. 1. Отслоение эпителия от базальной мембраны. 2. Слущивание клеток эпителия. 3. Некроз.

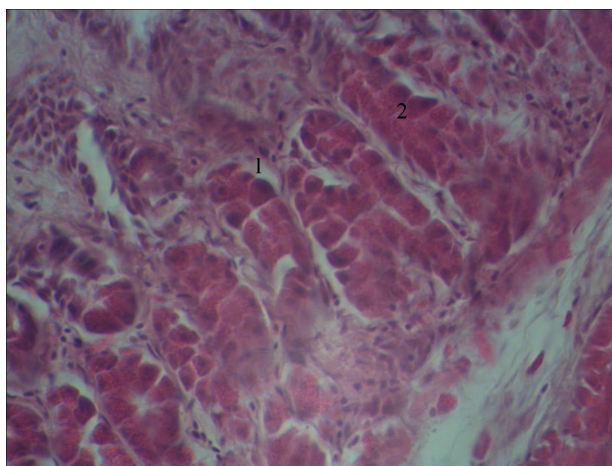


Рис. 2. Фрагмент желудка черноморской ставриды. ОК. 10, ОБ. 40. Гематоксилин-эозин. 1. Отслоение эпителия от базальной мембраны. 2. Заполненные секретом клетки желудочных желез.

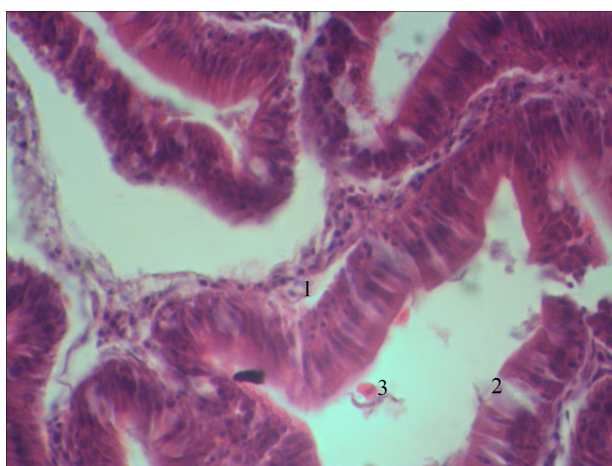


Рис. 3. Фрагмент средней кишки ставриды. ОК. 10, ОБ. 40. Гематоксилин-эозин. 1. Отслоение эпителия от базальной мембраны. 2. Бокаловидные клетки. 3. Клетки крови в просвете кишки.

слизистой оболочки относительно равномерно. Поверхность ворсинок и крипт черноморских рыб была выстлана однослойным эпителием, состоящим из призматических, каемчатых, бокаловидных, панетовских пролиферирующих клеток. Каемчатые клетки составляли основную массу клеток ворсинок и имели на апикальной поверхности типичные по строению микроворсинки. Ядра клеток были овальной формы, располагались в базальной части. Крипты средней кишки были выстланы однослойным низкопризматическим эпителием. На дне крипт редко обнаруживались апикально зернистые клетки (клетки Панета), которые имели призматическую форму, характерную оксифильную зернистость над ядром, расположенным в базальной части клетки.

Собственная пластинка слизистой оболочки кишечника рыб состояла из рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани, содержала кровеносные капилляры, образующие микроциркуляторное русло и нервные волокна.

Следует отметить, что кишечные ворсинки у исследуемых рыб были разной высоты и толщины. По всей высоте ворсинок были расположены бокаловидные клетки, некоторые переполнены гранулярноподобным секретом. Достаточно редко встречались гипертрофированные бокаловидные клетки. Ряд ворсинок имел участки отслоения клеток эпителия от базальной мембраны, причем у скорпены эпителий некоторых ворсинок практически полностью отошел от базальной мембраны. На верхушках кишечных ворсин мерланга и скорпены были отмечены участки некроза эпителиальных клеток, причем встречались участки, где эпителиальные клетки были некротизированы до базальной мембраны. У черноморской барабули и ставриды наблюдался отек слизистой оболочки, в результате которого базальная мембрана практически не определялась. В кишечных криптах имелся секрет. Кровеносные капилляры были переполнены форменными элементами крови. Некоторые кровеносные капилляры были повреждены, и форменные элементы крови находились в просвете кишки (рис. 3).

Таким образом, гистологический анализ позволил выявить патологические изменения в тканях средней кишки, на основании которых можно оценить степень поражения черноморской ставриды и черноморской барабули в 2,0 балла, мерланга – в 3,4, черноморского ерша – в 3,6 балла и шиповатого ската – в 3,8 балла.

Повышенное содержание загрязняющих веществ в концентрациях, превышающих значения ПДК, создают токсический фон для гидробионтов, в результате в их организмах начинаются соответствующие ответные реакции. Кроме того, токсиканты способны концентрироваться в пограничных органах, вовлекаться в процессы метаболизма, что может вызывать нарушение структуры органов и являться одной из причин развития негативных процессов в организме [7]. Длительное поступление токсических агентов с пищей приводит к ослаблению защитных свойств организма. Проведенное исследование желудка и средней кишки показало наличие разнообразных изменений в тканях этих органов. У всех анализируемых рыб были отмечены патологические изменения в строении слизистой оболочки, проявляющиеся в ее отеке, кровоизлиянии, некрозе. Наиболее сильные поражения тканей органов были отмечены у мерланга, морского ерша и шиповатого ската. Возможно, это связано с тем, что мерланг, шиповатый скат и ерш миграций не совершают и обитают в шельфовых водах Черного моря. В результате они постоянно находятся в зоне действия токсических элементов. На основании вышесказанного можно заключить, что выявленные морфологические изменения в исследуемых органах являются следствием и ответной реакцией на воздействия различных экологических факторов, в том числе токсических компонентов, содержащихся в морской воде.

Выводы

1. Наиболее тяжелые морфологические нарушения были отмечены у мерланга, морского ерша и шиповатого ската.

2. Основными патоморфологическими нарушениями в строении желудка и средней кишки у исследуемых рыб были отек слизистой оболочки, кровоизлияния и некроз ее участков.

Список литературы

1. Акт проверки «Международный параллельный аудит Бухарестской конвенции по защите Черного моря от загрязнения (Краснодарский край)» в Администрации Краснодарского края. Г. Краснодар, 3 октября 2003 г. – Краснодар, 2003.

2. Брянцев, В. А., Литвиненко, Н. М., Себах, Л. К. Антропогенное воздействие на экосистему Черного моря [Текст] / В. А. Брянцев, Н. М. Литвиненко, Л. К. Себах // Труды ЮгНИРО, 1997. – Т. 43. – С. 16–28.

3. Волкова, О. В. Основы гистологии с гистологической техникой [Текст] / О. В. Волкова, Ю. К. Елецкий // М. : Медицина, 1989. – 234 с.

4. Крючков, В. Н. Морфология органов и тканей водных животных [Текст] / В. Н. Крючков, Г. М. Абдурахманов, Н. Н. Федорова // М. : Наука, 2004. – 144 с.

5. Лесникова, Л. А., Чинирева, И. Д. Патологический анализ состояния рыб при полевых и экспериментальных токсикологических исследованиях [Текст] / Л. А. Лесникова, И. Д. Чинирева // Тезисы докладов 1-го Всесоюз. симпозиума по методам ихтиотоксикологических исследований. – Л., 1987. – С. 81–82.

6. Матишов, Г. Г. Современное состояние биоресурсов и экологическая ситуация в морях Западной Арктики [Электронный ресурс] / Г. Г. Матишов. – Режим доступа : <http://neva.transtec-neva.ru/files/File/arctic/arctic18.doc>.

7. Сайткулов, В. Р., Загрийчук, В. П. Нарушения правил рыболовства в Азово-Черноморском рыбохозяйственном бассейне [Текст] / В. Р. Сайткулов, В. П. Загрийчук // Рыбное хозяйство. – 2016. – № 2. – С. 59–61.

АППАРАТ ДЛЯ ИМПУЛЬСНОЙ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОЙ ТЕРАПИИ «УМИ-05»

На протяжении многих лет клиника БНПЦ ЧИН и Институт Ветеринарной Биологии (Санкт-Петербург) используют в своей практике уникальный прибор – генератор низкочастотного магнитного импульсного излучения большой мощности «УМИ-05» (ранее «УИМТ-2», «УИМТ-3»). Данный прибор применяется для моноили комплексной терапии целого ряда заболеваний, которые ранее считались неизлечимыми или очень тяжело поддавались лечению.

Основные направления применения «УМИ-05»

- Заболевания мочевой системы: мочекаменная болезнь, пиелонефрит, поликистоз, цистит.
- Желчекаменная болезнь.
- Заболевания опорно-двигательного аппарата: остеохондроз позвоночника, дископатия, артрозо-артриты, бурсит, растяжение связок, ушибы, контрактуры суставов, миозит.
- Купирование эпилептических приступов и эпилептического статуса.
- Гипертензия.
- Отит гнойный.
- Отит аллергический.

Стандартный курс лечения

- 10 сеансов по 30–50 импульсов на одну патологическую область. Мощность 50–80 %. Курс можно повторить с перерывом в 10 дней.
- Профилактический курс для животных группы риска (остеохондроз, МКБ и пр.) – 7–10 сеансов с интервалом 6 месяцев.
- Применение прибора не вступает в противоречие с использованием фармакологических и хирургических методов лечения.
- Магнитотерапию не следует проводить на области тела, содержащей металлоконструкции (например, штифты или пластины для остеосинтеза).

Экономика

- Быстрая окупаемость прибора.
- Минимальная затрата рабочего времени: длительность одного сеанса на одну патологическую зону – 2–3 минуты.
- Высокая эффективность лечения, полное излечение или введение животного в стойкую ремиссию по всем перечисленным заболеваниям гарантируют значительное увеличение рейтинга клиники в целом и приток новых клиентов.

Стоимость прибора 27000 рублей

Заказать УМИ - 05 можно по тел./факсу: (812) 927-55-92 доб 208; (812) 612-13-34 доб. 208 или по e-mail: ivb-info@mail.ru. подробности на сайте: www.invetbio.spb.ru



УДК 619:616–078.37:619:616.3:636.7/8

Ключевые слова: ультразвуковое исследование (УЗИ), пищеварительный канал, кошки, собаки, кишечник, диагностика, ультразвуковые артефакты, артефакт мерцания, моделирование артефактов

Key words: *ultrasonography (US), alimentary canal, cats, dogs, intestine, diagnostics, ultrasound artifacts, twinkling artifact, modeling artifacts*

Цыганский Р. А.

**АРТЕФАКТЫ ПРИ УЛЬТРАЗВУКОВОМ ИССЛЕДОВАНИИ
ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО КАНАЛА У МЕЛКИХ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ
И ИХ ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ**
*THE ARTIFACTS DURING ULTRASOUND SCREENING OF SMALL PETS' ALIMENTARY
CANAL AND THEIR DIAGNOSTIC VALUE*

ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет»

Адрес: 355017, Россия, г. Ставрополь, Зоотехнический пер., д.12

Stavropol State Agrarian University, Federal State Educational Institution of Higher Education

Address: 355017, Russia, Stavropol, Zootechnicheskij ln., 12

Цыганский Роман Александрович, к. б. н., доцент каф. физиологии, хирургии и акушерства.

E-mail: *fvm-fvm@yandex.ru*. Тел. +7 865 228-72-01

Tsyganskiy Roman A., PhD in Biological Sciences, Associate Professor of the Dept. of Physiology, Surgery and Obstetrics. E-mail: fvm-fvm@yandex.ru. Tel. +7 865 228-72-01

Аннотация. Статья посвящена описанию артефактов, возникающих при транскутанном ультразвуковом исследовании (УЗИ) пищеварительного канала у собак и кошек в норме и при патологии по характеристике их диагностической значимости. УЗИ проводили на сканерах SonoAce R7 (Samsung Medison Co., Ltd., Seoul, South Korea) и SIUI Apogee 1100 Omni (Shantou Institute of Ultrasonic Instruments Co., Ltd., Guangdong, China) по общепринятой методике с использованием мультисекторных конвексных и линейных датчиков с частотами 3,5-12 МГц. Воспроизведение артефакта мерцания в модели осуществляли при помощи пластикового контейнера с водой, в который помещали объекты с различной плотностью и интерфейсом. УЗИ проводили в В-режиме, цветного доплеровского картирования (ЦДК), энергетического доплеровского картирования, спектральном режиме и в режиме В-flow. Описаны эхографическое проявление и локализация артефактов у здоровых собак и кошек при сканировании пищеварительного канала в В-режиме: акустической тени, реверберации, «хвост кометы», дистального эхоакустического псевдоусиления сигнала; в режиме ЦДК – артефакта движения. Приведены артефакты, сопровождающие патологические процессы и состояния пищеварительного канала, указаны особенности и локализация данных артефактов.

Summary. *The article describes artifacts during the transcutaneous ultrasound screening of cats and dogs' alimentary canal with and without pathology by their characteristics of diagnostic value. Ultrasound was performed by the scanner SonoAce R7 (Samsung Medison Co., Ltd., Seoul, South Korea) and SIUI Apogee 1100 Omni (Shantou Institute of Ultrasonic Instruments Co., Ltd., Guangdong, China) by usual method with using multifrequency convex and linear transducers with 3,5-12 MHz frequency. The reconstitution of twinkling artifact in the model was made by plastic container with water where objects with different density and interface were put in. The study was performed in B-mode, Colour Doppler Sonography (CDS), Power Doppler Imaging, spectral mode and B-flow. The characteristic of artifacts caused by the ultrasound screening of patients tissues are given without artifacts, connected with hardware setup and external influence. Health dogs and cats' sonographic sing and localisation of artifacts were described during B-mode scanning of gastrointestinal tract: acoustic shadowing, reverberation, ring-down artifact, through-transmission artifact and kinetic artifact in CDS. Artifacts accompanying pathological processes and conditions of the digestive canal are given, features and localization of these artifacts are indicated.*

Введение

Значительным достоинством ультразвукового исследования (УЗИ) является его многоплоскостной характер в режиме реального времени. Изменение угла сканирования и глубины проникновения ультразвукового потока в ткани в подавляющем большинстве позволяет дифференцировать очаговые и

диффузные изменения тканей и органов [4]. Однако изображения, получаемые в ходе диагностического ультразвукового обследования, не всегда чёткие и полноценные в сравнении с другими методами визуальной диагностики. Это связано с несколькими причинами: опытом специалиста ультразвуковой диагностики, особенностями

и состоянием пациента, настройками и характеристиками оборудования, физическими закономерностями распространения ультразвуковой волны в биологических тканях [4, 7, 10]. Все указанные причины способствуют формированию ультразвуковых артефактов.

По определению Васильева А. Ю. с соавт. (2006), «артефакт – это явление, наблюдаемое при исследовании объекта, не свойственное этому объекту и искажающее результаты исследования. В ультразвуковой диагностике под артефактом подразумеваются изображения и эффекты, не представляющие собой истинного отражения реальных анатомических структур, искажающие их действительное расположение, размеры и характеристики» [3].

Устройство и программное обеспечение ультразвукового сканера имеют следующие особенности: ультразвук распространяется только по прямой линии; эхо-сигналы отражаются только от поверхностей, расположенных вдоль оси датчика; интенсивность отраженных эхо-сигналов непосредственно связана с плотностью отображаемого объекта; расстояние от датчика до объекта пропорционально времени распространения ультразвуковой волны в тканях в оба конца, что в среднем рассчитывается сканером как 1540 м/сек или 13 микросекунд на 1 сантиметр глубины. Однако, биологические ткани неоднородны, поэтому возникают множественные изменения направления распространения ультразвукового сигнала, а при переходе волн из одной среды в другую происходит изменение направления распространения волн, меняется время распространения звука через жир, жидкость и пр., происходит переход энергии ультразвуковых волн в другие виды энергии (тепло), вызванный вязкостью среды. Всё это приводит к формированию артефактов [3, 9].

При оценке анатомических структур акустические артефакты приводят к появлению дополнительных, несуществующих или, напротив, отсутствующих структур; неправильно расположенных структур; искажению формы или размера структур. Наложения различных артефактов на изображения органов и тканей приводят к искажению эхогенности, что может создавать иллюзию диффузных или очаговых поражений.

Проблеме артефактов в гуманитарной УЗ диагностике посвящен целый ряд публикаций [1, 3, 5, 10]. Так, Богданович Б. Б. с соавт. (2008) даёт описание основным артефактам при УЗИ и отмечает, что артефакты искажают ультразвуковое изображение или способствуют установлению правильного диагноза. Диагностическое значение артефакты играют в 50,4 % случаев [1]. Ультрасонографическое обнаружение газа в брюшной полости и органах по характерным артефактам облегчает диагностику и может в некоторых случаях определить тактику лечения [6]. Ультразвуковым артефактам в гуманитарной гастроэнтерологии посвящена статья Tuma, J. et al. (2016), в которой авторы описывают клинически значимые артефакты [10].

Актуальна проблема ультразвуковых артефактов и в ветеринарии, однако публикации не так многочисленны. В работах Robert M. (1995) [9] и Бушаровой Е. В. (2008) [2] приведена классификация артефактов, учитывающая артефакты, обусловленные причинами, которые можно контролировать до процедуры визуализации (внешние помехи и артефакты, возникающие по причине оператора) и артефакты, обусловленные взаимодействием ультразвука с тканями пациента. Последние классифицируются как клинически полезные и формирующие иллюзии [9].

Углубленное знание причин, устранение и интерпретация артефактов являются необходимым условием для правильной клинической оценки ультразвуковых изображений [4, 10].

В отечественной и зарубежной литературе недостаточно освещены вопросы, касающиеся диагностической ценности ультразвуковых артефактов в ветеринарной гастроэнтерологии мелких домашних животных.

Цель исследования: описать артефакты, возникающие при транскутанном ультразвуковом исследовании желудочно-кишечного тракта у собак и кошек в норме и при патологии, охарактеризовать их диагностическую значимость.

Материалы и методы

Объектом исследования служили разновозрастные и разнопородные кошки и со-

баки обоих полов. Исследования проведены в Научно-диагностическом и лечебном ветеринарном центре ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» и Ветеринарном центре «на Пирогова» г. Ставрополя в период с 2012 по 2016 год. Учитывались результаты обследования 45-ти собак и 53-х кошек. УЗИ проводили на сканерах SonoAce R7 (Samsung Medison Co., Ltd., Seoul, South Korea) и SIUI Apogee 1100 Omni (Shantou Institute of Ultrasonic Instruments Co., Ltd., Guangdong, China) по общепринятой методике с использованием мультисекторных и линейных датчиков с частотами 3,5-12 МГц. Животных обследовали в дорсальном, левом и правом боковом лежачем положении. Воспроизведение артефакта мерцания в модели осуществляли при помощи пластикового контейнера с водой, в который помещали различные объекты, подобранные по 4-м критериям: объекты с низкими отражающими свойствами и ровной поверхностью (силикон), объекты с низкими отражающими свойствами и шероховатой поверхностью (пористый поролон), объекты с высокой отражающей способностью и гладкой поверхностью (стеклянные и стальные шарики) и объекты с высокой отражающей способностью и шероховатой поверхностью (фрагменты твердой горной породы). Исследование проводилось в режимах двумерной серошкальной визуализации (В-режим), цветного доплеровского картирования (ЦДК), энергетического доплеровского картирования (ЭДК), спектральном режиме и в режиме В-flow.

Результаты исследований

В наших исследованиях мы не учитывали артефакты, связанные с аппаратными настройками и внешними воздействиями, такими как наводка от электрооборудования, недостаточно удаленный волосяной покров, недостаточная или чрезмерная установка мощности ультразвука и пр. Устранение подобных артефактов - первостепенная задача даже для начинающего врача УЗИ диагностики, и она должна решаться до проведения обследования. Мы характеризуем артефакты, вызванные воздействием звука на ткани пациента.

При сканировании пищеварительного канала здоровых животных в В-режиме визуализи-

руется несколько артефактов. Так, при наличии в полости желудка или кишечника плотных масс или при скоплении большого количества газа, дистальнее возникает артефакт акустической тени. Характер тени зависит от степени выраженности отражающей или поглощающей способности содержимого полости. При высокой степени отражения ультразвука возникает «чистая» акустическая тень в виде черной полосы за объектом на мониторе сканера. Такой артефакт встречается при исследовании ободочной кишки (рис. 1А). Тень от масс в желудке не имеет полной «чистоты» из-за диффузного рассеивания эхосигнала (рис. 1Б).

При патологии артефакт акустической тени визуализируется от инородных тел в полости пищеварительного канала (рис. 2, 3А, 3Б, 6Б), от очагов минерализации (рис. 7В, 7Г).

Другим ультразвуковым артефактом при исследовании пищеварительного канала в В-режиме у здоровых животных является артефакт реверберации. Эхографически реверберация проявляется серией ярких параллельных линий, регулярно определяющихся

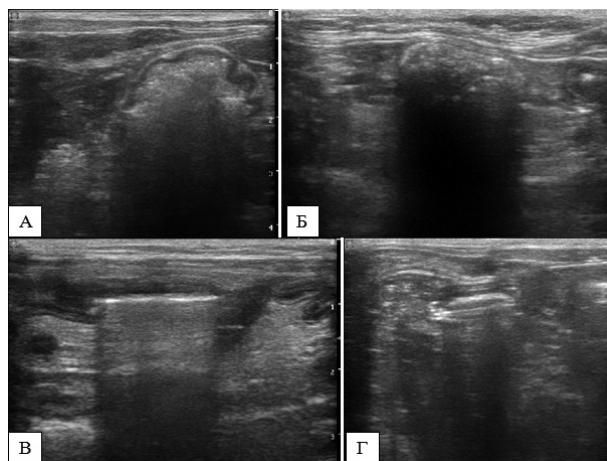


Рис. 1. А – артефакт акустической тени, обусловленный наличием естественного содержимого пищеварительного канала (фундальный отдел наполненного пищевыми массами желудка кошки, поперечный скан в области мечевидного отростка). Артефакт акустической тени не позволяет визуализировать стенку желудка, расположенную дистально от датчика. Б – акустическая тень от содержимого нисходящей ободочной кишки кошки при поперечном сканировании. В, Г – артефакты, обусловленные наличием плоских инородных тел: В - монета в тощей кишке у 2-х летнего беспородного кота, Г - пуговица в двенадцатиперстной кишке у беспородной 14-ти месячной кошки (сканирование произведено по плоскости инородного тела, визуализируемого в виде гиперэхогенной полосы) (Г).

с равными интервалами дистальнее объектов со средами с различным акустическим сопротивлением. Данный артефакт можно визуализировать в желудке, тонком и толстом отделе кишечника (рисунок 3В, 3Г). В ряде случаев артефакт реверберации обнаруживается при наличии инородных тел кишечника, обладающих высокой отражающей способностью (рисунок 4А, 4Б).

Артефакты реверберации и акустической тени не дают возможности визуализировать дистальную стенку исследуемого отдела пищеварительного канала.

Ещё одним артефактом в режиме серой шкалы является «хвост кометы». Он возникает от пузырьков газа при их поверхностном расположении в газосодержащих структурах, при этом происходят собственные колебания пузырька в результате множественных отражений ультразвука внутри него, обуславливающих короткие реверберации. Данный артефакт визуализируется в виде множественных ярких линий, создающих эхогенный «хвост» дистальнее пузырька. Артефакт в норме можно визуализировать в желудке, тонком и толстом отделе кишечника. При патологии артефакт «хвост кометы» регистрируется в газосодержащих абсцессах, в сопряжённых с пищеварительным каналом структурах и в лимфоузлах (рис. 4В, 4Г), при эмфизематозных воспалительных процессах (рис. 5А, 5Б), пневмонии, пневмоперитонеуме при перфорации пищеварительного канала.

Артефакт дистального эхоакустического псевдоусиления сигнала возникает позади слабо поглощающих ультразвук сред, к которым относятся жидкостные и содержащие жидкость объекты и в норме проявляется за желчным пузырём, содержащими жидкость желудком или за петлями кишечника (рис. 5В). В результате дистальная стенка желудка или кишечника, а также ткани, расположенные глубже, визуализируются более эхогенными. При патологии данный артефакт регистрируется при асците – в результате исследования структур пищеварительного канала обе стенки кишечника визуализируются более эхогенными. Нами зарегистрировано два клинических случая наличия силиконовых инородных тел, имитирующих содержание жидкости в кишечнике с артефактами дистального эхоа-

кустического псевдоусиления (рис. 5Г).

При исследовании пищеварительного канала в доплеровских режимах также возможна визуализация артефактов. Так, в режиме ЦДК в норме возможна визуализация артефакта движения, обусловленного моторикой желудка и кишечника, а также перемещением их содержимого. При этом регистрируется несвязанное с сердечным циклом экстравазкулярное смешанное сине-красное окрашивание движущихся стенок кишечника и содержимого (рис. 6А).

При наличии инородных тел в полости тонкого кишечника в ряде случаев мы регистрировали артефакт мерцания в режиме ЦДК, ЭДК, спектральном режиме и в режиме В-flow. В режиме ЦДК артефакт характеризуется быстроизменяющейся цветовой гаммой в виде смешивания красного и синего цветов, на поверхности обнаруженных объектов (рис. 6Б, 6В).

В режиме ЭДК определяется монохромное цветное окрашивание. В спектральном доплеровском режиме регистрируется спектр, представленный высокоамплитудными низкочастотными колебаниями, не имеющими волновой формы, и сопровождающийся специфическим звуковым сигналом («скрипом»). В режиме В-flow характерной визуализацией артефакта является мерцающая линейная структура белого цвета, напоминающая артефакт «хвост кометы», наблюдаемый в В-режиме. Интенсивность цветового окрашивания варьирует от единичных неустойчивых цветовых сигналов до выраженного устойчивого окрашивания поверхности. Спектральные характеристики остаются неизменными независимо от степени выраженности доплеровского артефакта в режимах ЦДК и ЭДК.

Однако, из наблюдаемых 34-х клинических случаев наличия инородных тел в тонком кишечнике у собак и кошек, артефакт мерцания регистрировали только при наличии объекта с высокими отражающими свойствами и шероховатой поверхностью (5 клинических случаев, в том числе четыре кошки).

При воспроизведении данного феномена в модели с использованием различных объектов, помещённых в контейнер с водой, артефакт мерцания в доплеровских режимах сканирования регистрировали только на объектах с вы-

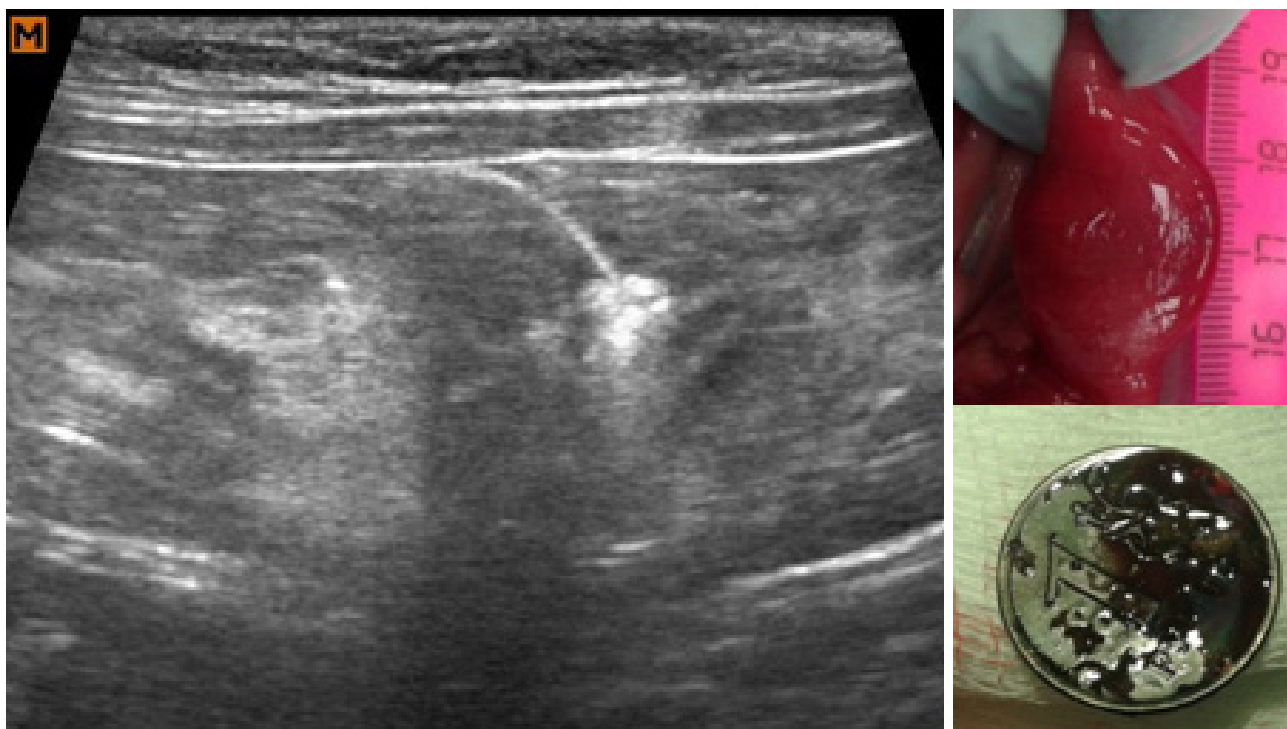


Рис. 2. Левая часть - артефакт акустической тени, обусловленный наличием монеты в тощей кишке у беспородного 18-ти месячного кота. Правая часть – интраоперационное фото петли кишечника с инородным телом и извлеченная в ходе энтеротомии монета. Сканирование произведено по ребру инородного тела (гурту монеты), визуализируемого в виде гиперэхогенной изогнутой линии.

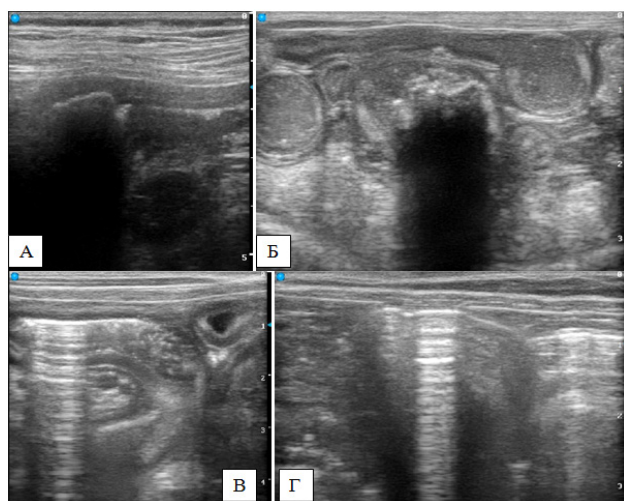


Рис. 3. Артефакты в режиме серой шкалы: А, Б – «чистая» акустическая тень, обусловленная наличием объёмных инородных тел. Фрагмент пластиковой игрушки в тощей кишке у 6-ти летней самки породы английский бульдог (продольный скан) (А), фрагмент пластиковой игрушки в тощей кишке у 18-ти месячной кошки породы донской сфинкс (поперечный скан). Вокруг петли кишечника с инородным телом поперечный срез петель с избыточным химусом (Б); В, Г – артефакт реверберации, обусловленный скоплением газа. Избыточный химус и газ в тощей кишке у 7-ми летнего самца собаки породы питбульерьер (продольный скан) (В), газ на фоне содержимого нисходящей ободочной кишки у кошки (продольный скан). По обе стороны реверберации дополнительно регистрируется артефакт акустической тени (Г).

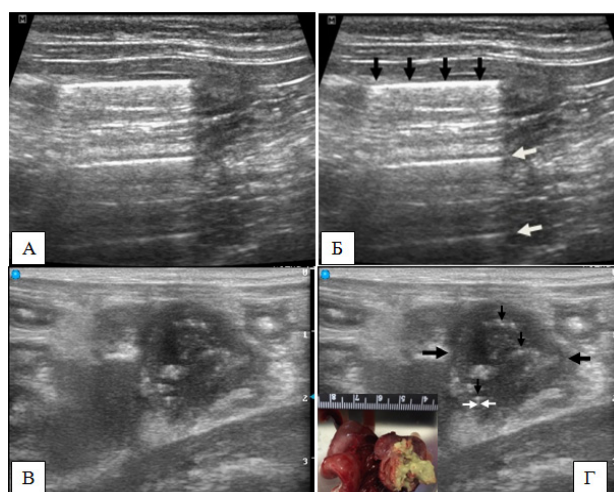


Рис. 4. А – артефакт реверберации, обусловленный наличием плоского инородного тела (монеты) в тощей кишке у беспородного 18-ти месячного кота. Б – то же с обозначениями: плоская поверхность монеты, визуализируемая в виде гиперэхогенной полосы (тёмные стрелки ↓↓), множественное отражение ультразвуковой волны между поверхностью монеты и трансдюсером в виде двух ярких параллельных линий дистальнее инородного тела (светлые стрелки ←←). В – артефакт «хвост кометы», обусловленный наличием мелких пузырьков газа при абсцедировании мезентериального лимфоузла у 5-ти месячной помесной кошки. Г – то же с обозначениями: абсцедированный лимфоузел (тёмные стрелки →→), пузырьки газа в полости абсцесса (тёмные стрелки ↓↓), артефакт «хвост кометы» (светлые стрелки →←).

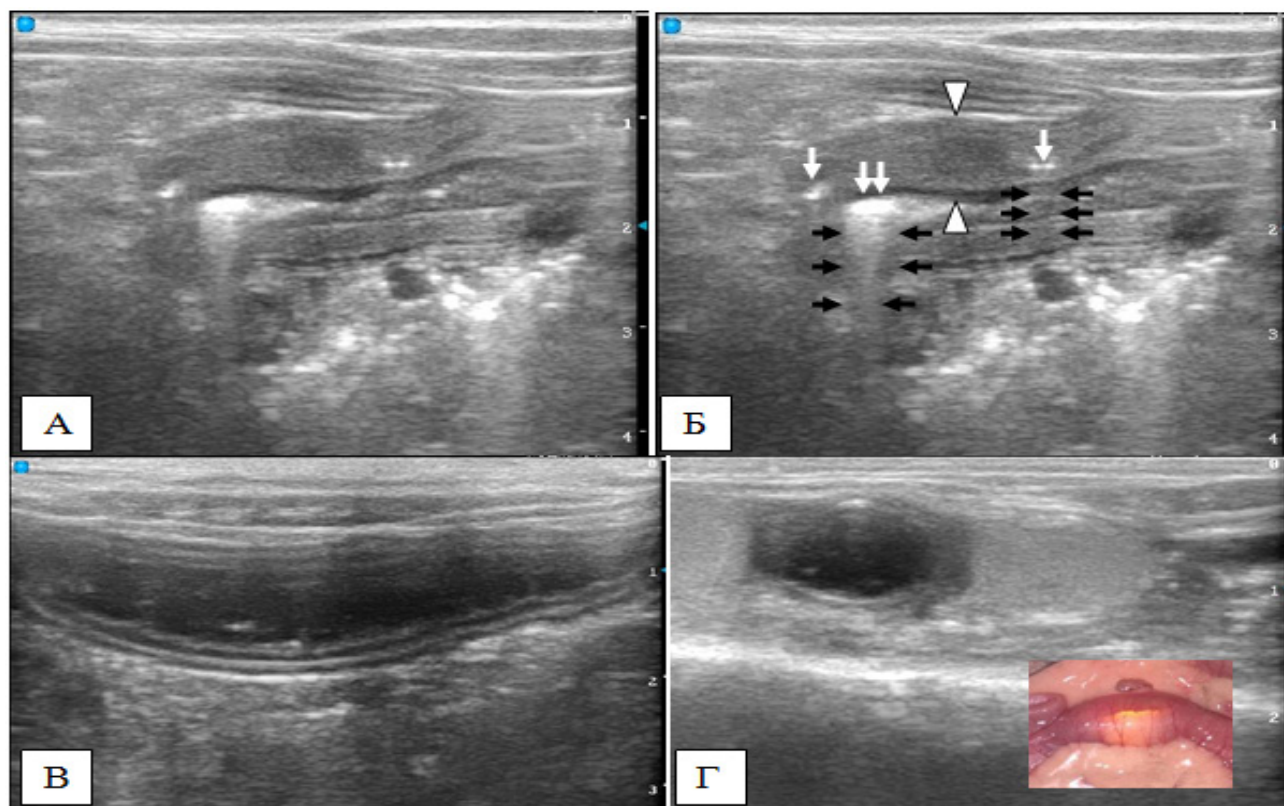


Рис. 5. Артефакты «хвост кометы» и дистального псевдоусиления сигнала. А – артефакт «хвост кометы», обусловленный наличием мелких пузырьков газа в полости и в стенке нисходящей ободочной кишки у 6-ти летнего самца собаки породы бультерьер при остром колите. Б – то же с обозначениями: значительно утолщённая стенка ободочной кишки (Δ), пузырьки газа в полости кишки (светлые стрелки \Downarrow), более мелкие пузырьки газа в подслизистом слое ободочной кишки (светлые стрелки \downarrow), артефакт «хвост кометы» дистальнее пузырьков газа (тёмные стрелки $\rightarrow\leftarrow$). В – артефакт дистального псевдоусиления сигнала. Жидкостный характер визуализации петли тощей кишки собаки. Слои дистальной стенки кажутся более эхогенными, также как и ткани, расположенные за стенкой. Г – комбинированный артефакт «хвост кометы» из-за пузырька газа в тощей кишке и псевдоусиление на дистальной стенке тощей кишки у 5-ти месячной беспородной кошки. Присутствие жидкости симитировано силиконовым инородным телом, которое эхографически визуализируется анэхогенным.

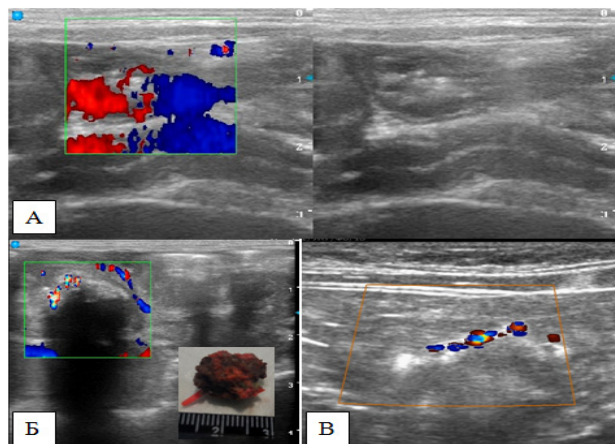


Рис. 6. Артефакты в доплеровских режимах. А – артефакт движения. Дуплексное сканирование: (В-режим+ЦДК) + (В-режим). Артефакт возник от перистальтирующих петель тощей кишки у 6-ти месячного самца питбультерьера. Визуализируется атипичное смешанное цветное доплеровское окрашивание стенок кишечника в момент движения. Б, В – артефакт мерцания. Дуплексное сканирование: В-режим+ЦДК. Артефакт мерцания представлен яркой цветовой гаммой в результате смешивания красного и синего цветов на поверхности инородного тела. Фрагмент пластиковой игрушки в тощей кишке у 18-ти месячной кошки породы донской сфинкс. Дистальнее инородного тела акустическая тень (Б). Инородное тело (монета) в тощей кишке у беспородного 18-ти месячного кота. Артефакт мерцания возник от рифлёного гурта монеты (В).

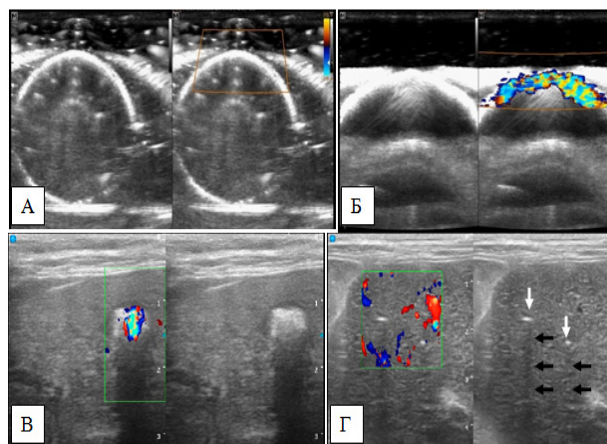


Рис. 7. Артефакты в доплеровских режимах. Дуплексное сканирование (В-режим) + (В-режим+ЦДК). А – воспроизведение артефакта мерцания в модели. Отсутствие артефакта на гладкой поверхности стеклянного шара. Б – присутствие артефакта на шероховатой поверхности фрагмента твердой горной породы. Поверхность объектов в В-режиме визуализируется в виде гиперэхогенной линии, что указывает на их высокие отражающие свойства. В – артефакт мерцания и артефакт акустической тени от очага минерализации в печени у 8-ми летнего беспородного кота. Г – отсутствие артефакта мерцания от мелких очагов минерализации (1,5-2 мм) в паренхиме печени (\downarrow) при наличии акустической тени (\leftarrow) у 14-ти месячного беспородного кота. При ЦДК визуализируются только сосуды печени.

сокой отражающей способностью и шероховатой поверхностью (рис. 7А, 7Б). В ряде случаев артефакт мерцания регистрировали от очагов минерализации в паренхиме печени (рис. 7В), однако проявление артефакта зависело от размеров данных очагов. Артефакт отсутствует при наличии очагов менее 3-х мм (рис. 7Г).

Обсуждение результатов

Как известно, в основе принципа ультразвуковой визуализации является отражение ультразвукового потока от поверхностей тканей с различной плотностью. Эти отражения воспринимаются датчиком и формируют изображение на мониторе сканера. Процент отражённой ультразвуковой энергии прямо пропорционален разнице акустических импедансов на границе тканей. Акустический импеданс, или комплексное акустическое сопротивление вещества, определяется исходя из плотности этого вещества и скорости распространения звука в нём. Чем больше плотность, тем выше акустический импеданс. Области вещества со сходными акустическими характеристиками эхосигнала не формируют, а на границе разделения ткань/газ отражается практически 100 % ультразвуковой энергии [3]. В полости пищеварительного канала всегда присутствует определённое количество газа в результате аэрофагии, бактериальной ферментации, поэтому в естественных условиях постоянно регистрируются артефакты реверберации, «хвост кометы», при наличии пищевых и каловых масс – артефакт акустической тени. Данные артефакты создают помехи для исследования, поскольку не дают возможности визуализировать дистальную стенку пищеварительного канала и ткани, расположенные ниже. Поэтому для более информативного исследования необходимо выдерживать животного на 8–12 часовой голодной диете.

В ряде случаев данные артефакты могут иметь важное диагностическое значение. Так, избыточное скопление газа в полости пищеварительного канала, сопровождаемое артефактами акустической тени и реверберации, может наблюдаться при завороте желудка, метеоризме кишечника. Артефакт реверберации мы также регистрировали от плоских инородных тел тонкого кишечника

в 3-х клинических случаях.

Артефакт «хвост кометы», сопровождающий экстралюминальный газ, может быть признаком перфорации пищеварительного канала, а наличие этого артефакта в сопряжённых с ним структурах (стенка кишечника, желчные протоки, лимфоузлы) может быть признаком эмфизематозных, септических процессов. Визуализация акустической тени за объектом в тонком кишечнике – частый маркёр инородного тела, причём чем «чище» тень, тем более высокой отражающей способностью обладает объект. Данный артефакт мы визуализировали в 87 % случаев наличия нелинейных инородных тел в тонком кишечнике у собак и кошек.

Артефакт дистального эхоакустического псевдоусиления сигнала может влиять на интерпретацию результатов исследования кишечника при наличии в нём жидкости и маскировать наличие инородных тел с низким акустическим импедансом. Дистальная стенка при этом выглядит гиперэхогенной. Имитацию данного артефакта мы наблюдали за фрагментом силиконового инородного тела в кишечнике. Полипозиционное исследование позволяет определить истинное изменение эхогенности стенки и подлежащих тканей от артефактного.

Известно, что в доплеровских режимах сканирования контраст между потоком крови и тканями обеспечивается различием между движущимся и стационарным акустическим интерфейсом, передачей цветом движущихся эритроцитов и отображением стационарных отражателей в серой шкале. В целом это результируется визуализацией мягких тканей как серой тени и кровеносных сосудов как цвета. Однако в случае движения мягких тканей их колебания могут детектироваться как артефактное цветовое смешанное экстраваскулярное отображение. Артефакт движения может быть использован для подсчёта количества сокращений кишечника, а его отсутствие – сигнализировать о гипотонии или атонии.

Дополнительную информацию об исследуемом объекте может дать артефакт мерцания в доплеровских режимах сканирования. Впервые в ветеринарии артефакт мерцания описан, по-видимому, в 2006 году - при мочекаменной болезни у собак и кошек [8]. Описание арте-

факта мерцания при исследовании пищеварительного канала в литературе ограничено и в основном посвящено кальцинатам паренхимы печени и холелитиазу. Ольхова Е. Б. (2007) регистрировала артефакт мерцания в 27,8 % случаев при обнаружении копролитов различных размеров у детей [5]. Однако автор принимала за артефакт мерцания все случаи возникновения атипичного доплеровского окрашивания при исследовании плотных объектов, мягкотканых структур или потока воздуха, а поэтому, возможно, учитывала доплеровский артефакт движения, как артефакт мерцания. Артефакт движения от жидкости или перемещения газа в перистальтирующей петле кишечника отличает нестабильность и быстрое изменение характера его проявления, что связано с перистальтикой, при этом эффект состоит из множественных отдельных цветных сигналов линейной формы.

Мы регистрировали данный артефакт в 14,7 % случаев наличия инородных тел в полости пищеварительного канала и не регистрировали его при наличии копролитов. Воспроизведение нами артефакта мерцания в модели показало, что он возникает на объектах с шероховатой поверхностью и высокой отражающей способностью. Данный феномен возникает, на наш взгляд, из-за разнонаправленного отражения ультразвукового потока от множественных рефлекторов, создающих шероховатости на поверхности объекта, при этом сдвиг результирующей потоков при обработке сигнала от множественных рефлекторов приводит к формированию артефакта.

В наших исследованиях мы регистрировали артефакт мерцания от очагов минерализации в паренхиме печени, однако при наличии очагов менее 3-х мм артефакт отсутствовал, что можно объяснить малой отражающей поверхностью и небольшой разницей акустических импедансов на границе раздела.

Заключение

Ультразвуковые артефакты всегда сопровождают УЗИ пищеварительного канала у собак и кошек. У здоровых животных в В-режиме исследования регистрируются артефакты акустической тени, реверберации, «хвост кометы», дистального псевдоакустического усиления сигнала; в режиме ЦДК – артефакт движения. При избыточном содержании газа, жидкости или пищевых

масс артефакты создают помехи для исследований, затрудняя визуализацию или иллюзорно изменяя эхографические характеристики стенки (в случае с артефактом дистального эхоакустического псевдоусиления). При патологических процессах и состояниях пищеварительного канала, таких как наличие инородных тел, перфорация стенки, эмфизематозные и септические процессы, сопровождаемые газообразованием в структурах пищеварительного канала, указанные артефакты, регистрируемые в В-режиме сканирования, имеют важное диагностическое значение и выступают в качестве дополнительных ультразвуковых маркеров. Регистрация артефакта мерцания в доплеровских режимах сканирования на поверхности объектов в пищеварительном канале свидетельствует об их высокой отражающей способности и шероховатой поверхности и обнаруживается на некоторых инородных телах и очагах минерализации.

Список литературы

1. Богданович, Б. Б. Физические артефакты в ультразвуковой диагностике и их клиническое значение [Текст] / Б. Б. Богданович, М. В. Гольцев // Военная медицина. – 2008. – № 1 (6). – С. 32–34.
2. Бушарова, Е. В. К вопросу о помехах и артефактах при проведении ультразвуковых исследований у собак и кошек [Текст] / Е. В. Бушарова // Ветеринарная практика. – 2008. – № 3 (42). – С. 130–138.
3. Васильев, А. Ю. Артефакты в ультразвуковой диагностике [Текст] / А. Ю. Васильев, А. И. Громов, Е. Б. Ольхова [и др.] // М. : ФГОУ «ВУНМИЦ Росздрава», 2006. – 56 с.
4. Зорин, Я. П. Основы анализа ультразвукового изображения. Часть 2 [Текст] / Я. П. Зорин, М. Г. Бойцова, Н. А. Карлова // Лучевая диагностика и терапия. – 2015. – № 1 (6). – С. 88–93.
5. Ольхова, Е. Б. Мерцающий артефакт в детской ультразвуковой диагностике [Текст] / Е. Б. Ольхова // Радиология – практика. – 2007. – № 7. – С. 36–45.
6. Kiefer, I. Sonographic detection of gas as aid in making a diagnosis [Текст] / I. Kiefer [et al.] // Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere – Heimtiere. – 2008. – Vol. 36. – № 3. – P. 177–184.
7. Lang, J. Ultrasound Artefacts. In: Mannion, P. Diagnostic ultrasound in small animal practice [Текст] / J. Lang // Iowa: Blackwell Publishin. – 2007. – P. 20–25.
8. Louvet, A. Twinkling artifact in small animal Color-Doppler sonography [Текст] / A. Louvet // Veterinary Radiology and Ultrasound. – 2006. – Vol. 47. – № 4. – P. 384–390.
9. Robert, M. Kirberger Imaging artifacts in diagnostic ultrasound – a review [Текст] / M. Robert // Veterinary Radiology and Ultrasound. – 1995. – Vol. 36. – № 4. – P. 297–306.
10. Tuma, J. Ultrasound artifacts and their diagnostic significance in internal medicine and gastroenterology – Part I: B-mode [Текст] / J. Tuma [et al.] // Zeitschrift fur Gastroenterologie. – 2016. – Vol. 54. – № 5. – P. 433–450.

УДК 578.827.1

Ключевые слова: ретровирус, лейкоз, домашняя птица, мониторинг, ПЦР

Key words: *retrovirus, leukosis, poultry, monitoring, PCR*

Карамендин К. О., Саятов М. Х., Кыдырманов А. И., Нуршин К. А., Сулейменова С.

ЦИРКУЛЯЦИЯ ВИРУСОВ ЛЕЙКОЗА ПТИЦ В КАЗАХСТАНЕ И ИХ РАННЯЯ МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА В ПЦР *CIRCULATION OF AVIAN LEUKOSIS VIRUSES AND THEIR EARLY MOLECULAR DIAGNOSTICS BY PCR*

Республиканское государственное предприятие «Институт микробиологии и вирусологии» Комитета науки
Министерства образования и науки Республики Казахстан. Адрес: 050010, Республика Казахстан,
г. Алматы, ул. Богенбайбатыра, д. 103.

*Institute of Microbiology and Virology, Republican State Enterprise of Science Committee of Education
and Science Ministry of the Republic of Kazakhstan.*

Address: 050010, Republic of Kazakhstan, Almaty, Bogenbaybatyr str., 103

Карамендин Кобей Омертаевич, вед. науч. сотрудник лаборатории экологии вирусов. Тел. (727) 291-84-97
Karamendin Kobey O., Leading Researcher in the Laboratory of Viral Ecology. Tel. +7 (727) 291-84-97

Саятов Марат Хусаинович, гл. науч. сотрудник лаборатории экологии вирусов
Sayatov Marat H., Chief Researcher in the Laboratory of Viral Ecology

Кыдырманов Айдын Исагалиевич, зав. лабораторией экологии вирусов
Kudyrmanov Aidyn I., Head of the Laboratory of Viral Ecology

Нуршин Куандык Аманбаевич, ст. науч. сотрудник лаборатории экологии вирусов
Nurshin Kuandyk A., Senior Researcher in the Laboratory of Viral Ecology

Сулейменова Сымбат, старший лаборант
Suleymenova Symbat, Senior Laboratory Assistant

Аннотация. В настоящей статье описываются результаты молекулярной диагностики лейкоза птиц с целью получения новых данных по распространению различных генетических вариантов вируса в птицеводствах юго-востока Республики Казахстан. На птицефабрике из юго-востока Казахстана произошла массовая вспышка болезни среди птицепоголовья различных возрастов. Осуществлен скрининг собранных материалов с помощью ПЦР, в результате которого получены положительные результаты в шести исследованных на лейкоз птиц пробах. Проведенные нами исследования с помощью ПЦР позволяют выявить на ранних стадиях циркуляцию ВЛП¹ в птицеводческих хозяйствах Казахстана, что имеет важное значение для своевременного принятия профилактических мероприятий.

Summary. This article describes the results of molecular diagnostic of leukosis in poultry, in order to obtain new data about distribution of various genetic variants of the virus among poultry farms at southeast of the Republic of Kazakhstan. There was a massive outbreak of disease among domestic birds of different ages in the poultry farms at southeast of Kazakhstan. The screening of collected materials by PCR-method was performed, and positive results were obtained in six samples which were tested for leukemia. Our studies using RT-PCR can detect the early stages of the avian leukosis virus that circulate among poultry farms in Kazakhstan, and that is essential for the timely maintenance of prophylactic measures.

Введение

Одним из самых актуальных заболеваний, причиняющих существенный урон птицеводству, является лейкоз птиц. Наносимый им ущерб складывается из гибели и вынужденного убоя птицы, резкого снижения яйценоскости, нарушения процессов воспроизводства в племенном птицеводстве, браковки тушек, ограничительных мероприятий [5].

Лейкоз птиц (лат. *Leukosis avium*; гемобластоз, лейкопения, белокровие, гепатолимфоматоз, лимфобластоз) – неопластическая

вирусная болезнь, характеризующаяся системными опухолевидными разрастаниями кроветворной ткани [1].

Вирус лейкоза относится к семейству ретровирусов (*Retroviridae*), подсемейству *Oncovirinae*. Все онкогенные вирусы имеют общее свойство – при заражении ими чувствительных животных они индуцируют опухоли.

У кур, инфицированных вирусом лейкоза птиц (ВЛП), на вторые-третьи сутки наблюдается интенсивное размножение в крови

¹ ВЛП – вирус лейкоза птиц (прим. ред.)

возбудителя, однако птицы не выделяют его во внешнюю среду. Вирусемия сменяет вирусносительство в течение всей жизни. Выделение вирусов начинается с момента размножения возбудителя в паренхиматозных органах и продолжается до гибели птицы. От больной птицы вирус выделяется со слюной, экскрементами и яйцами.

Болезнь регистрируют в более чем 50-ти странах с развитым птицеводством у многих видов птиц, однако чаще болеют куры, у которых она в основном и диагностируется [4].

ВЛП делится на шесть подгрупп А, В, С, D, Е и J на основании различий в поверхностных гликопротеидных белках вирусов, ответственных за образование вируснейтрализующих антител, перекрестную интерференцию и определяющих круг хозяев [9].

Экзогенные подгруппы А, В, С, D и J горизонтально и вертикально передаются потомству [3], но эндогенная подгруппа Е наследуется по закону Менделя [8].

Изучением лейкоза птиц вплотную начали заниматься в 1970-е гг., когда эпизоотии в коммерческих стадах были обычным явлением, и смертность от заболевания составляла около 2 %. В то время чаще выделяли вирусы лейкоза подгруппы А, реже – подгруппы В, а С и D еще не были распознаны.

Анализ литературы указывает на трансконтинентальное распространение вируса. В конце 1980-х и начале 1990-х гг. высокопатогенная разновидность ВЛП (J) вызвала значительную гибель птиц в Великобритании и Японии. В середине 1990-х гг. вирус распространился в других европейских странах и достиг США и Аргентины. Впоследствии в 2000-х гг. вирус обнаружили в Китае и Малайзии [2, 6, 7].

Несмотря на успехи, достигнутые в искоренении заболеваемости лейкозом птиц в развитых странах, вирус завоевывает все более прочные позиции в таких странах, как Китай, где наблюдается заболеваемость кур не только мясного, но и яичного направления.

Сельское хозяйство Казахстана также уязвимо для заноса ВЛП на его территорию, и проведение систематического мониторинга

является актуальной задачей сегодняшнего дня. Несмотря на повсеместную распространенность болезни и изученность природы самого ВЛП, мониторинг заболеваемости в Казахстане не проводился, современных данных о распространении вируса в регионе не имеется.

В настоящей статье описываются результаты молекулярной диагностики лейкоза птиц с целью получения новых данных по распространению различных генетических вариантов вируса в птицеводствах юго-востока РК.

Материалы и методы

Сбор полевых материалов. Для вирусологических, молекулярно-биологических исследований биопробы собирали стерильными пинцетами от павших птиц после патологоанатомического вскрытия и помещали в стерильные флаконы с транспортной средой. Все пробы до проведения исследований хранили в жидком азоте (-196°C).

Выделение РНК из биологических образцов проводили с использованием набора QIAampViralRNAMinikit (Qiagen GmbH, Hilden) или с помощью TrizolLS в соответствии с рекомендациями производителей.

КДНК из РНКВЛП получали методом обратной транскрипции с использованием универсального праймера random hexamer.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с праймерами к консервативной последовательности env-гена ВЛП (AD1-F GGGAGGTGGCTGACTGTGT и H7-R CGAACCAAAGGTAACACACG) при следующих условиях: начальная 2-х мин денатурация ДНК при 95°C, тринадцать циклов, включающих денатурацию (93°C, 1 мин), отжиг праймеров (60°C, 1 мин) с понижением температуры на один градус с каждым циклом, удлинение цепи (72°C, 1 мин 30 сек), затем 30 циклов амплификации, включающих денатурацию (93°C, 1 мин), отжиг праймеров (48°C, 1 мин) и удлинение цепи (72°C, 1 мин 30 сек) с последующей окончательной элонгацией при 72°C, 10 мин. Реакцию ставили в термоциклере Eppendorf Gradient (Германия).

В качестве положительного контроля использовали РНК изолята ВЛП/цыпленок/Алматы/44/2013, отрицательного контроля – деионизированную воду.

Электрофоретический анализ продуктов ПЦР проводили в 2 % растворе агарозы (Sigma, США) в трис-ацетатном буфере при напряжении 88V (8 вольт/см) на аппарате Biostep (Великобритания).

Результаты исследований и обсуждение

Сбор биологических образцов в птицеводческих хозяйствах Казахстана и их скрининг с помощью ПЦР

Основанием для сбора материала и проведения клинико-морфологических и молекулярно-генетических исследований кур в одной из птицефабрик юго-востока Казахстана явилась массовая вспышка болезни среди птицепоголовья различных возрастов. В начале вспышки симптомы болезни с летальным исходом проявлялись у небольшого количества взрослых кур. Постепенно количество больных и павших особей нарастало. Массовому охвату болезни вначале подверглись куры-несушки в возрасте 423 дня, затем, через 17 дней, – куры в возрасте 440 дней, и спустя несколько дней болезнь охватила и бройлерных цыплят 30-ти дневного возраста. Заболевшие птицы погибали в большом количестве в состоянии общего сильного угнетения. Всего от домашних птиц в хозяйстве на юго-востоке Казахстана собраны биологические образцы от 30-ти больных кур в виде кусочков органов, мазков и цельной крови, а также костного мозга из бедренной кости.

Осуществлен скрининг собранных материалов в ПЦР, в результате которого получены положительные результаты в шести исследованных пробах (рис. 1).

Как представлено на рисунке 1, в результате реакции с праймерами к участку env-гена вируса лейкоза кур ожидаемый продукт в ~326 пар оснований обнаружен в шести исследованных образцах, что свидетельствует о циркуляции ВЛП подгрупп А, В, С, D или E среди домашних птиц.

Всегда существует вероятность появления новых ретровирусов в результате

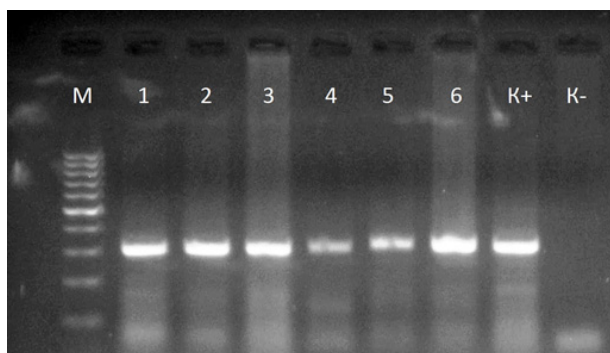


Рис. 1. Результаты ПЦР с РНК, выделенными из биопроб от домашних кур в птицефабрике юго-восточного Казахстана. Обозначения: «М» – ДНК маркер; «К+» – положительный контроль (ВЛП/цыпленок/Алматы/44/2013); «К-» – отрицательный контроль (деионизированная вода); «№ 1-6» – нумерация проб.

мутаций, примером чего может служить обнаружение в 1980-х гг. вируса лейкоза подгруппы J, явившегося продуктом редкой генетической рекомбинации между экзо- и эндогенными вирусами. Данный вирус, вызывающий миелоидный лейкоз, распространился по всему миру и явился причиной значительных экономических потерь в птицеводстве. Следовательно, в будущем возможно появление новых измененных вариантов, представляющих угрозу для сельского хозяйства.

На сегодняшний день в литературе мало сведений о частоте заболеваемости лейкозом в птицеводческих хозяйствах, характере и степени поражения отдельных органов и тканей. До сих пор остается сложным и спорным вопрос дифференциальной диагностики отдельных форм лейкоза от других болезней со сходной клиникой и патологоанатомическими проявлениями. По клиническим признакам болезнь не распознается; гематологические исследования, имеющие некоторое значение для выявления эритробластоза и лимфоидного лейкоза птиц, сложно проводить в значимых масштабах.

Заключение

Проведенные нами исследования с помощью ОТ-ПЦР позволяют выявить на ранних стадиях циркуляцию ВЛП в птицеводческих хозяйствах Казахстана, что имеет важное значение для своевременного принятия профилактических мероприятий.

Список литературы

1. Сюрин, В. Н., Самуйленко, А. Я., Соловьев, Б. В., Фомина, Н. В. Вирусные болезни животных [Текст] / В. Н. Сюрин, А. Я. Самуйленко, Б. В. Соловьев, Н. В. Фомина // М.: ВНИТИБП, 1998. – 928 с.

2. Fadly, A. M., Smith, E. J. Isolation and some characteristics of an isolate associated with myeloid leukemia in meat-type chickens in the United States [Текст] / E. J. Smith, A. M. Fadly // Avian Diseases. – 1999. – № 43. – P. 391–400.

3. Fadly, A. M., Payne, L. N. Leukosis/sarcoma group [Текст] / A. M. Fadly, L. N. Payne // Diseases of poultry. – 2003. – № 11. – P. 465–516.

4. Fadly, A. M. Avian tumor diseases [Текст] / A. M. Fadly // Proc. 14th World Vet. Poult. Congr. Exhibit. Istanbul, Turkey, 2005. – P. 4.

5. Fenton, S. P., Reddy, M. R., Bagust, T. J. Single and concurrent avian leukosis virus infections with avian leukosis virus J and avian leukosis virus A in Australian meattype chickens [Текст] / S. P. Fenton, M. R. Reddy, T. J. Bagust // Avian Pathology. – 2005. – № 34. – P. 48–54.

6. Payne, L. N., Brown, S. R., Bumstead, N., Howes, K., Frazier, J. A., Thouless, M. E. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens [Текст] / L. N. Payne, S. R. Brown, N. Bumstead, K. Howes, J. A. Frazier, M. E. Thouless // Journal of General Virology. – 1991. – № 72. – P. 801–807.

7. Payne, L. N., Gillespie, A. M., Howes, K. Induction of myeloid leukemia and other tumors with the HPRS-103 strain of ALV [Текст] / L. N. Payne, A. M. Gillespie, K. Howes // The Veterinary Record. – 1991. – № 129. – P. 447–448.

8. Pham, T. D., Spencer, J. L., Johnson, E. S. Detection of avian leukosis virus in albumen of chicken eggs using reverse transcription polymerase chain reaction [Текст] / T. D. Pham, J. L. Spencer, E. S. Johnson // J. Virol. Methods. – 1999. – № 78. – P. 1–11.

9. Zhang, H. M., Bacon, L. D., Cheng, H. H., Hunt, H. D. Development and validation of a PCR-RFLP assay to evaluate TVB haplotypes coding receptors for subgroup Band subgroup E avian leukosis viruses in White Leghorns [Текст] / H. M. Zhang, L. D. Bacon, H. H. Cheng, H. D. Hunt // Avian Pathol. – 2005. – № 34. – P. 324–331.

Сканеры УЗИ “РАСКАН”

Достоверность, доступность и простота ультразвуковых исследований в ветеринарии

Все виды исследований у крупных, средних и мелких животных. УЗИ домашних и экзотических животных и птиц.

Контроль стельности в животноводстве и продуктивности в птицеводстве

Полностью цифровая обработка. Высокая плотность лучей. Динамическая фокусировка. Цветовое доплеровское картирование. Пунктирование. Кинопетля. Помощь. Персональные настройки. Все виды измерений. Вычисления. Заключение. Распечатка эхограмм. Архив. Ветеринарные расчеты и пиктограммы



5,9 кг



Датчики мультимодальные высокой плотности. Рабочие частоты от 2,5 до 10 МГц. Конвексные, линейные, полостные с

Сканеры в настольной комплектации с возможностями стационарных. Легкие, компактные с автономным питанием. Кейс для переноски.



3,7 кг

Сканеры в мобильной комплектации. Брызгозащитное исполнение. Сенсорный экран. Ручка для переноски. Наплечный ремень.



Организованы курсы ветеринарные УЗИ

НПП
“РАТЕКС”

Производство сканеров УЗИ с 1991 года

199178, С.-Петербург, ул. Донская, д. 19, пом.1Н
Тел./факс: (812)321-89-74, 321-57-71, (931)966-58-32
E-mail: rateks@rateks.com http://rateks.com

УДК 575.224.22

Ключевые слова: MyoD1, северокавказская порода, мутация, мясная продуктивность, секвенирование, SNP
Key words: MyoD1, North Caucasus breed, mutation, meat efficiency, sequencing, SNP

Телегина Е. Ю., Криворучко А. Ю., Скрипкин В. С., Яцык О. А.

ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЕ ЗАМЕНЫ В ГЕНЕ MYOD1 У ОВЕЦ СЕВЕРОКАВКАЗСКОЙ ПОРОДЫ *SINGLE-NUCLEOTIDE SUBSTITUTIONS IN MYOD1 GENE OF NORTH CAUCASUS BREED SHEEPS*

ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет»

Адрес: 355017, Россия, г. Ставрополь, Зоотехнический пер., д.12

Stavropol State Agrarian University, Federal State Educational Institution of Higher Education

Address: 355017, Russia, Stavropol, Zootechnicheskiy ln., 12

Телегина Елена Юрьевна, аспирант каф. частной зоотехнии, селекции и разведения животных.

E-mail: telegina.helen@yandex.ru. Тел. (903) 409-24-72

Telegina Elena Y., Post-Graduate Student of the Dept. of Private Animal Husbandry, Selection and Breeding.

E-mail: telegina.helen@yandex.ru. Tel. +7 (903) 409-24-72

Криворучко Александр Юрьевич, д. б. н., профессор каф. физиологии, хирургии и акушерства.

E-mail: rcvm@yandex.ru. Тел. (8652) 28-67-38

Krivoruchko Alexander Y., Doctor of Biological Sciences, Professor of the Dept. of Physiology, Surgery and Obstetrics.

E-mail: rcvm@yandex.ru. Tel. +7 (8652) 28-67-38

Скрипкин Валентин Сергеевич, к. в. н., доцент каф. физиологии, хирургии и акушерства.

E-mail: skripkinvs@mail.ru. Тел.(8652) 28-67-38

Skripkin Valentin S., PhD in Veterinary Sciences, Associate Professor of the Dept. of Physiology, Surgery and Obstetrics. E-mail: skripkinvs@mail.ru. Tel. +7 (8652) 28-67-38

Яцык Олеся Андреевна, аспирант каф. физиологии, хирургии и акушерства.

E-mail: malteze@mail.ru. Тел. (918) 757-14-58

Yatsyk Olesya A., Post-Graduate Student of the Dept. of Physiology, Surgery and Obstetrics.

E-mail: malteze@mail.ru. Tel. +7 (918) 757-14-58

Аннотация. Целью данной работы явилось исследование структуры гена MyoD1 у овец северокавказской породы. Объектом исследования служили баранчики в возрасте одного года (n=30). Секвенирование осуществляли с использованием геномного секвенатора GS Junior (Roche, USA). Полученные в результате секвенирования фрагменты картировали на референсный геном Ovis aries сборки oviAri3 (National Center for Biotechnology Information. Genome. (2012) Ovisaries (sheep), 2015) с помощью программного обеспечения GS Reference Mapper v2.9 (Roche, USA).

В ходе работы выявлено 29 однонуклеотидных замен (SNP), 18 из них обнаружены впервые. Ранее описанные полиморфизмы в основном находятся в 5' фланкирующей области, и только одна замена с.325T>C - во втором экзоне. SNP с.325T>C и с.483C>T являются синонимичными и не приводят к аминокислотной замене. Частота встречаемости SNP у северокавказской породы оказалась близкой к иранским и марокканским породам овец. Необходимо проводить дальнейшее исследование структуры гена MyoD1, структуры белка, влияние SNP на прижизненные показатели мясной продуктивности.

Summary. The aim of this work was to study the structure of the MyoD1 gene among sheep breed of North Caucasus. We has investigated 30thsheep male (n=30) at the age of one year. A sequencing was performed with using a genomic sequencer GS Junior (Roche, USA). The resulting sequencedfragments mapped at the reference genome assembly Ovis Aries oviAri3 (The National Center for Biotechnology Information. Genome. (2012) Ovis Aries (sheep), 2015) by software GS Reference Mapper v2.9 (Roche, USA).

During the work were identified 26 single nucleotide substitutions (SNP), 16 replacements were found firstly. The previously described polymorphisms mainly locate into 5' flanking region and only one replacement c.325T> C locate into second exon. SNP c.325T> C and C.483C> T are synonymous and do not lead to amino acid replacement. The frequency of occurrence of SNP among North Caucasus breed sheeps is close to Iranian and Moroccan sheeps. It is necessary to continue further study of the structure of the gene MyoD1, protein structure and effect of SNP at the in vivo characteristics of meat productivity.

Введение

Актуальным направлением в генетике является изучение генетического полиморфизма у сельскохозяйственных животных, связанного с показателями мясной продуктивности. Благодаря маркер-ассоциированной селекции - высокопродуктивному методу улучшения отбора и прогнозирования продуктивных качеств сельскохозяйственных животных, возможно ускорить селекционную работу и уменьшить связанные с ней затраты [8].

В настоящее время активно ведутся поиски SNP (single nucleotide polymorphism) – однонуклеотидных замен у разных видов продуктивных животных. Особенности последовательности четырех нуклеотидов отражают различия между отдельными животными, породами, популяциями. Это генетические маркеры, часть которых может быть связана с количественными и качественными признаками животных [3].

Северокавказская порода – одна из наиболее распространенных и высокопродуктивных полутонкорунных пород овец [1]. Вывели ее путем скрещивания ставропольских овцематок с баранами Ромни-марш и Линкольн. Овцы этой породы удачно сочетают в себе высокую доходность шерсти со скороспелостью и убойными качествами. Характеризуются хорошей шерстной и мясной продуктивностью. Разводят северокавказских овец преимущественно в Северо-Кавказском федеральном округе, а также в некоторых центральных регионах России [2].

Ген MyoD1 является одним из генов-кандидатов для определения полиморфизмов, ассоциированных с интенсивностью роста и развития, и, как следствие, с показателями мясной продуктивности у овец [5]. Он играет ключевую роль в миогенезе и связан с развитием мышц у млекопитающих. Влияет на дифференцировку мышечных клеток [10].

Было изучено влияние полиморфизма гена MyoD1 у крупного рогатого скота на качество и нежность мяса, на показатели живого и убойного веса [9].

У свиней доказано существенное воздействие замен в гене MyoD1 на мышечные волокна и мясные качества, также выявлена

взаимосвязь SNP гена MyoD1 с мраморностью мяса [7].

У уток было исследовано влияние гена MyoD1 на рост мышц и развитие организма в целом [4]. У овец позитивная корреляция обнаружена между уровнем экспрессии гена MyoD1 и весом охлажденной туши [6].

В связи с этим, целью нашего исследования явилось изучение структуры гена MyoD1 у овец северокавказской породы.

Материалы и методы

Исследование было проведено на базе ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет». Объектом исследования служили баранчики в возрасте одного года северокавказской породы (n=30).

Геномная ДНК выделялась из образцов крови, полученных из яремной вены в асептических условиях. Пробы крови отбирали в пробирки Vacutainer® со стабилизатором ЭДТА. ДНК выделяли из 0,2 мл крови с использованием набора Pure Link Genomic DNA MiniKit (Invitrogen, USA). С целью выявления мутаций в генах проводили целевое обогащение и последующее секвенирование исследуемых фрагментов ДНК. Для обогащения целевых регионов использовали технологию Nimble Gen (Roche, USA). Зонды для целевых регионов были разработаны в сотрудничестве с фирмой Roche Nimble Gen (USA). Библиотеки фрагментов ДНК исследуемых животных, подготовленные в соответствии с протоколом Rapid Library Preparation Method Manual, подвергали процедуре обогащения с использованием зондов Nimble GenSeqCapEZ Developer Libraries в соответствии с протоколом производителя (Roche, USA).

Процедуру моноклональной амплификации готовых обогащенных целевых регионов ДНК проводили по стандартному протоколу PCR Amplification Method Manual, Lib-L (Roche, USA).

Секвенирование осуществляли с использованием геномного секвенатора GS Junior (Roche, USA). Полученные в результате секвенирования фрагменты картировали на референсный геном *Ovis aries* сборки *oviAri3* (National Center for Biotechnology Information).

Genome. (2012) Ovisaries (sheep), 2015) с помощью программного обеспечения GS Reference Mapper v2.9 (Roche, USA). Для описания обнаруженных однонуклеотидных замен (SNP) использовалась номенклатура HGVS (Human Genome Variation Society).

Результаты исследований

В результате проведенной работы нами было обнаружено 29 однонуклеотидных замен (SNP) в кодирующих и регуляторных участках гена MyoD1 северокавказской породы овец (табл. 1). Из них 18 SNP были выявлены впервые, остальные 11 внесены в базу данных National Center for Biotechnology Information.

Ранее описанные полиморфизмы в основном находятся в 5' фланкирующей области, и только одна замена с.325T>C – во втором экзоне. Четыре из обнаруженных нами SNPs: с.-1608C>T, с.-1603G>T, с.-1578G>A, с.-932G>T расположены в 5' фланкирующей области, и 14 SNP (с.243C>A, с.244C>T, с.246G>T, с.253G>T, с.259G>C, с.261C>T, с.269C>G, с.274C>A, с.276C>G, с.277C>A, с.279C>T, с.281C>A, с.287C>A, с.483C>T) – в области второго экзона.

Из 15-ти замен, находящихся в области второго экзона, две (с.325T>C и с.483C>T) являются синонимичными, 13 SNP приводят к аминокислотной замене. Некоторые несинонимичные SNP расположены в паре внутри одного триплета. В гене MyoD1 мы обнаружили четыре триплета модифицированных таким образом: с.244C>T и с.246G>T; с.259G>C и с.261C>T; с.274C>A и с.276C>G; с.277C>A и с.279C>T.

Среди выявленных у северокавказской породы мутаций 48 % составляют транзиции и 52 % – трансверсии. У большинства животных чаще встречаются замены в области второго экзона в гомозиготном мутантном варианте. Замены с. -1807C>T, с.-1447C>T встречаются у трех животных в гетерозиготном мутантном варианте. Редкими мутациями являются с.-1607C>A, с.-932G>T, с.243C>A. Замены с.-1578G>A, с.-880G>A, с.-637C>T, с.325T>C встречаются у овец северокавказской породы только совместно и только в гетерозиготном варианте.

Обсуждение результатов

Изучена структура гена MyoD1 у северокавказской породы овец. В российских и зарубежных источниках отсутствует информация о влиянии структуры гена MyoD1 на мясную продуктивность овец.

Согласно нашим исследованиям, ген MyoD1 имеет множество вариаций. Наибольшее количество SNP расположены в области второго экзона в гетерозиготном мутантном варианте и в основном обнаружены впервые. Подобная структура гена у северокавказской породы подтверждает то, что в ходе селекционной работы дикая форма гена MyoD1 была практически полностью исключена из популяции. Закрепление мутаций в гомозиготной форме может быть следствием отбора пар для скрещивания, где носители мутантных аллелей отличались наилучшими качествами.

У овец северокавказской породы мы обнаружили две группы замен (с.-1578G>A, с.-880G>A, с.-637C>T, с.325T>C) и (с.-1807C>T, с.-1447C>T) присутствующие в гетерозиготном варианте и только совместно. У марокканских пород замены (с.-1807C>T, с.-1447C>T) также присутствуют сцепленно и только совместно, что позволяет предположить их сцепленное наследование. SNP с.-932G>T, с.-1607C>A, с.243C>A обнаружена у небольшого количества животных. Поэтому конкретных выводов, связанных с этой мутацией, сделать невозможно.

Частота встречаемости однонуклеотидных замен в гене MyoD1 северокавказской породы овец оказалась близкой к иранским и марокканским породам овец (dbEnsembl). В области экзона расположена SNP с.325T>C, которая имеет частоту встречаемости 7 %. Это меньше, чем у иранских овец, на 13 %, а у марокканских – на 8 %. Частота встречаемости замены с.-637C>T северокавказской породы одинаковая с марокканскими породами овец, но меньше на 5 %, чем у иранских овец. Также одинаковую частоту встречаемости (13 %) с марокканскими породами овец имеют такие замены, как с.-1447C>T, с. -1807C>T. Процент распространения мутации с.-2112C>G северокавказской породы овец – 7 %, что меньше, чем у марокканских (19 %) и иранских (10 %). SNP с.-880G>A, с.-1235G>A северокавказской

Мутации в гене MyoD1 у овец Северокавказской породы

№	Наименование SNP по номенклатуре HGVS	Идентификатор в базе NCBI	Позиция на хромосоме	Аминокислотная замена	Аллель		Генотип		
1	c.-2112C>G	rs404884444	34373234	-	G	C	GG	GC	CC
					0,93	0,07	0,87	0,13	0,00
2	c.-1807C>T	rs597385459	34372929	-	G	A	GG	GA	AA
					0,9	0,1	0,8	0,2	0,00
3	c.-1806A>G	rs424553252	34372928	-	T	C	TT	TC	CC
					0,17	0,83	0,00	0,33	0,67
4	c.-1687T>C	rs406278149	34372809	-	A	G	AA	AG	GG
					0,37	0,63	0,2	0,33	0,47
5	c.-1608C>T	нет в базе	34372730	-	G	A	GG	GA	AA
					0,00	1,00	0,00	0,00	1,00
6	c.-1607C>A	rs596561479	34372729	-	G	T	GG	GT	TT
					0,97	0,03	0,93	0,07	0,00
7	c.-1603G>T	нет в базе	34372725	-	C	A	CC	CA	AA
					0,00	1,00	0,00	0,00	1,00
8	c.-1578G>A	нет в базе	34372700	-	C	T	CC	CT	TT
					0,93	0,07	0,87	0,13	0,00
9	c.-1447C>T	rs425767816	34372569	-	G	A	GG	GA	AA
					0,9	0,1	0,8	0,2	0,00
10	c.-1235G>A	rs412308724	34372357	-	C	T	CC	CT	TT
					0,63	0,37	0,47	0,33	0,2
11	c.-932G> T	нет в базе	34372054	-	C	A	CC	CA	AA
					0,97	0,03	0,93	0,07	0,00
12	c.-880G> A	rs412662330	34372002	-	C	T	CC	CT	TT
					0,93	0,07	0,87	0,13	0,00
13	c.-637C> T	rs409662616	34371759	-	G	A	GG	GA	AA
					0,93	0,07	0,87	0,13	0,00
14	c.-412G> T	rs420129038	34371534	-	C	A	CC	CA	AA
					0,9	0,1	0,8	0,2	0,00
15	c.243C> A	нет в базе	34370879	F/L	G	T	GG	GT	TT
					0,93	0,07	0,93	0,00	0,07
16	c.244C> T	нет в базе	34370878	R/C	G	A	GG	GA	AA
					0,07	0,93	0,07	0,00	0,93
17	c.246G> T	нет в базе	34370876	R/C	C	A	CC	CA	AA
					0,07	0,93	0,07	0,00	0,93
18	c.253G> T	нет в базе	34370869	G/C	C	A	CC	CA	AA
					0,00	1,00	0,00	0,00	1,00
19	c.259G> C	нет в базе	34370863	G/R	C	G	CC	CG	GG
					0,00	1,00	0,00	0,00	1,00
20	c.261C> T	нет в базе	34370861	G/R	G	A	GG	GA	AA
					0,00	1,00	0,00	0,00	1,00
21	c.269C> G	нет в базе	34370853	P/R	G	C	GG	GC	CC
					0,00	1,00	0,00	0,00	1,00
22	c.274C> A	нет в базе	34370848	P/T	G	T	GG	GT	TT
					0,00	1,00	0,00	0,00	1,00

№	Наименование SNP по номенклатуре HGVS	Идентификатор в базе NCBI	Позиция на хромосоме	Аминокислотная замена	Аллель		Генотип		
					G	C	GG	GC	CC
23	с.276C> G	нет в базе	34370846	P/T	G	C	GG	GC	CC
					0,00	1,00	0,00	0,00	1,00
24	с.277C> A	нет в базе	34370845	P/T	G	T	GG	GT	TT
					0,00	1,00	0,00	0,00	1,00
25	с.279C> T	нет в базе	34370843	P/T	G	A	GG	GA	AA
					0,00	1,00	0,00	0,00	1,00
26	с.281C> A	нет в базе	34370841	T/N	G	T	GG	GT	TT
					0,00	1,00	0,00	0,00	1,00
27	с.287C> A	нет в базе	34370835	A/D	G	T	GG	GT	TT
					0,00	1,00	0,00	0,00	1,00
28	с.325T> C	rs599663516	34370797	L	A	G	AA	AG	GG
					0,93	0,07	0,87	0,13	0,00
29	с.483C> T	нет в базе	34370639	A	G	A	GG	GA	AA
					0,00	1,00	0,00	0,00	1,00

породы овец имеют близкий процент распространения мутаций с иранскими и марокканскими породами овец. Частота встречаемости мутации с.-1607C>A у северокавказской породы овец является близкой (4 %) к иранским и марокканским овцам, однако мутантной у северокавказской породы является аллель T, а у иранских и марокканских овец – аллель A. Это свидетельствует о том, что в одной позиции может встречаться три различных аллеля.

Заключение

Исследование показало вариабельность гена MyoD1. Из 29-ти выявленных полиморфизмов 18 обнаружены впервые. Пятнадцать однонуклеотидных замен расположены в области экзона, следовательно, могут влиять на структуру кодируемого пептида. В области экзона расположены замены в гомозиготном мутантном варианте, кроме SNP с.325T>C, которая обнаружена в гетерозиготном варианте. Исследования должны быть направлены на изучение влияния обнаруженных SNP на структуру и активность кодируемой аминокислоты, а также на мясную продуктивность северокавказских пород овец.

Список литературы

1. Квитко, Ю. Д. Мясная продуктивность северокавказской мясошерстной породы овец и её помесей [Текст] / Ю. Д. Квитко, И. И. Черкасова // Сборник науч. трудов Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства. – 2007. – № 1–1. – С. 77–79.

2. Отрадных, В. А. Продуктивность овец северокавказской породы [Текст] / В. А. Отрадных, Ю. Н. Фролов // Овцы, козы, шерстяное дело. – 2005. – № 1. – С. 40.

3. Яковлев, А. Ф. ДНК-технологии в селекции сельскохозяйственных животных [Текст] / А. Ф. Яковлев, М. Г. Смарагдов, В. С. Матюков // Достижения науки и техники АПК. – 2011. – № 8. – С. 49–50.

4. Bhuiyan, M., Kim, N., Cho, Y. Identification of SNPs in MYOD gene family and their associations with carcass traits in cattle [Текст] / M. Bhuiyan, N. Kim, Y. Cho [et al.] // Livestock Science. – 2009. – Vol. 26. – P. 292–297.

5. Gerber, A. N., Klesert, T. R., Bergstrom, D. A. Two domains of MyoD mediate transcriptional activation of genes in repressive chromatin: A mechanism for lineage determination in myogenesis [Текст] / A. N. Gerber, T. R. Klesert, D. A. Bergstrom [et al.] // Genes & Development. – 1997. – Vol. 11. – № 4. – P. 436–450.

6. Knoll, A., Nebola, M., Dvorak, J. Detection of a DdeI/PCRFLP within intron 1 of the porcine MYOD1 (MYF3) locus [Текст] / A. Knoll, M. Nebola, J. Dvorak [et al.] // Animal Genetics. – 1997. – Vol. 28. – P. 321.

7. Lobo, A. M. B. O., Guimaraes, S. E. F., Paiva, S. R. Differentially transcribed genes in skeletal muscle of lambs [Текст] / A. M. B. O. Lobo, S. E. F. Guimaraes, S. R. Paiva [et al.] // Livestock Science. – 2012. – № 3. – P. 31–41.

8. Lee, E. A., Kim, J. M., Lim, K. S. Effects of variation in porcine MYOD1 gene on muscle fiber characteristics, lean meat production, and meat quality traits [Текст] / E. A. Lee, J. M. Kim, K. S. Lim [et al.] // Meat Science. – 2012. – Vol. 92. – P. 36–43.

9. Wu, Y., Pi, J. S., Pan, A. L. An SNP in the MyoD1 gene intron 2 associated with growth and carcass traits in three duck populations [Текст] / Y. Wu, J. S. Pi, A. L. Pan [et al.] // Biochemical Genetics. – 2012. – Vol. 50. – № 12. – P. 898–907.

10. Yang, Z. Q., Qing, Y., Zhu, Q. Genetic effects of polymorphisms in myogenic regulatory factors on chicken muscle fiber traits [Текст] / Z. Q. Yang, Y. Qing, Q. Zhu [et al.] // Journal of Animal Sciences. – 2015. – Vol. 28. – № 6. – P. 782–787.

УДК 619:637.075

Ключевые слова: сальмонеллы, *E. coli*, мясные продукты, время исследования

Key words: Salmonella, E. coli, meat products, time of research

Чугунова Е. О.

ВЫДЕЛЕНИЕ САЛЬМОНЕЛЛ ИЗ ПРОДУКТОВ, ОБСЕМЕНЕННЫХ *E. COLI* И *SALMONELLA SPP.* *THE ISOLATION OF SALMONELLA FROM PRODUCTS THAT CONTAMINATED BY E. COLI AND SALMONELLA SPP.*

ФГБОУ ВО «Пермская государственная сельскохозяйственная академия имени академика Д. Н. Прянишникова»
Адрес: 614990, Россия, г. Пермь, ул. Петропавловская, 23
*Perm State Agricultural Academy named after academician D. N. Pryanishnikov,
Federal State Educational Institution of Higher Education
Address: 614990, Russia, Perm, Petropavlovskaya str., 23*

Чугунова Елена Олеговна, к. в. н, доцент каф. внутренних незаразных болезней, хирургии и акушерства.

E-mail: chugunova.elen@yandex.ru. Тел. (912) 884-38-39

*Chugunova Elena O., PhD in Veterinary Sciences, Associate Professor of the Dept. Non-communicable diseases,
Surgery and Obstetrics. E-mail: chugunova.elen@yandex.ru. Tel. +7 (912) 884-38-39*

Аннотация. В статье представлены результаты исследований мяса и мясных продуктов, обсемененных бактериями группы кишечной палочки и дополнительно искусственно контаминированных клетками *E. coli* и *Salmonella spp.* Работа выполнена в Пермском ветеринарном диагностическом центре в период с 2014 по 2016 гг. В процессе лабораторных испытаний формировали опытные и контрольные образцы мясных продуктов массой по 25 г, которые инокулировали клетками сальмонелл и эшерихий в равных количествах: от 101 до 108 МТ. Контрольные пробы анализировали по ГОСТ 31659-2012 «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*», а опытные исследовали разработанным и запатентованным способом (патент РФ № 2570386). Результаты исследований показали, что чувствительность разработанного способа индикации сальмонелл выше, чем классического анализа. При внесении в образец по 10 микробных тел сальмонелл и эшерихий в опыте был получен положительный результат за 71,4±5,06 часа, на исследование контрольных образцов потребовалось больше времени, и в итоге лабораторных испытаний не обнаружили искомым микроорганизмов. Аналогичный результат получили при посевной дозе по 100 клеток *Salmonella spp.* и *E. coli*. При искусственной контаминации образцов в дозе от 1000 до 100 млрд. клеток как в опыте, так и в контроле были получены положительные результаты исследования. Однако на испытания контрольных образцов мясных продуктов оказалось затрачено в 1,5-2 раза больше времени, чем на анализ опытных проб.

Summary. *The article shows the results of research of meat and meat products that were contaminated by Coli form bacteria. Also it's artificially contaminated by E. coli and Salmonella spp. The work was performed in the Perm veterinary diagnostic center at the period from 2014 to 2016 years. During laboratory tests the experimental and control samples of meat products weighing 25 g, inoculated Salmonella and Escherichia cells in equal amounts from 101 to 108 cells were formed. Control samples were analyzed by GOST 31659-2012 "Food Products. Methods of the detection of Salmonella spp.". Experienced samples were analyzed by the patented method (№ 2570386) that was investigated and developed. The result of the research proved high sensitivity of the patented method indication of Salmonella unlike the classical analysis. Experience samples inoculated by 10 cells of Salmonella and Escherichia, and positive result was obtained during 71.4±5.06 hours. The analysis of control samples took more longer time and we have not found the desired microorganisms. Similar results were obtained when inoculated 100 cells of Salmonella spp. and E. coli. Artificial contamination of the samples by 1000 to 100 billion cells of Salmonella spp. and E. coli was positive both in experiment and in the control. However, at the testing of control samples of meat products were spent 1.5-2 times more than for analysis of the experimental samples.*

Введение

Мясо и мясопродукты различных видов сельскохозяйственных животных и птицы используют в пищу как источник биологически полноценных белков, жиров, необходимых для организма человека витаминов, макро- и микроэлементов. При этом нужно помнить, что человек зависит от состояния

здоровья животных, а также от качества и безопасности животноводческой продукции [1, 7]. По данным Туляковой Т. В. (2013), в 2011 году было зафиксировано увеличение удельного веса проб, не соответствующих гигиеническим нормам по санитарно-химическим показателям. В холодильниках предприятий общепита и торговли, где нередко

нарушают правила хранения мяса и яиц, такое интенсивное инфицирование продуктов – реальный факт. Вторичное обсеменение происходит чаще в разделочных цехах общепита и ресторанов, магазинах и в других торговых предприятиях. Известно, что сальмонеллы долго сохраняют свою жизнеспособность в колбасных изделиях (от 60-ти до 130-ти дней), в замороженном мясе (от 6-ти до 13-ти мес.), в яйцах (до 13-ти мес.), в яичном порошке (до 9-ти мес.). После длительного хранения в незамороженном виде мясо может стать опасным для человека, поскольку при благоприятных температурных условиях размножение микробов происходит каждые 20–30 минут, при этом бактериальная масса возрастает в геометрической прогрессии [2]. Кроме того, любой пищевой продукт животного или растительного происхождения при определенных условиях может быть фактором передачи инфекции при зоонозных сальмонеллезах [8, 9, 10]. Учитывая факт, что мясные продукты могут быть контаминированы ассоциацией микроорганизмов, в том числе сальмонеллами и эшерихиями [3], неоспорима актуальность и значимость проведенных нами исследований. Цель исследований – выделить единичные сальмонеллы из ассоциации с бактериями группы кишечной палочки.

Материалы и методы

Материалом для ветеринарно-санитарных исследований служили мясные продукты и субпродукты, мясные полуфабрикаты, которые ранее на питательных средах дали рост бактериям группы кишечной палочки (БГКП). Для искусственной контаминации данных проб продуктов использовали штаммы *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum-Pullorum*, *S. Dublin*, *S. Choleraesuis*, *S. Infantis*, *S. Hamburg*, *S. Virchow* и *E. Coli*, полученные из ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (всего 48 штаммов).

Метод исследования – бактериологический. Исходную бактериальную суспензию, содержащую 108 микробных тел (МТ), готовили в физиологическом растворе с помо-

щью оптического прибора *Densi-La-Meter* (*Erba Lachema*, Чехия). Биохимическую идентификацию выполняли на микробиологическом анализаторе *Multiskan FC* (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Финляндия) с помощью набора ЭНТЕРОтест 24h (*Arkray*, Япония). При этом определяли β -ксилоксидазную активность, способность ферментации салицина, сорбита, мелибиозы, целлобиозы, лактозы, трегалозы, маннита, дульцита, адонитола, арабитола, сахарозы, инозитола, раффинозы, расщепления мочевины, глюкуронидазы, способность декарбоксиллировать аргинин, орнитин, лизин, образовать сероводород, β -галактозидазу, утилизировать цитрат, малонат и эскулин. Согласно ГОСТ 31659-2012 «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*» определяли подвижность и способность сальмонелл образовывать ацетоин и индол. Серогрупповую принадлежность сальмонелл оценивали по результатам реакции агглютинации на предметном стекле, используя набор сыворолок сальмонеллезных О-комплексных и монорецепторных О- и Н-агглютинирующих (ФГУП «Курская биофабрика – «БИОК»).

В процессе выполнения исследований формировали опытные и контрольные образцы мясных продуктов массой по 25 г, которые инокулировали не только клетками сальмонелл, но и *E. coli* в равных количествах: от 101 до 108 МТ. Таким образом, общее количество БГКП в испытуемых образцах превысило численность внесенных сальмонелл. Затем контрольные пробы подвергали лабораторным испытаниям по ГОСТ 31659-2012, а опытные исследовали разработанным и запатентованным способом (патент РФ № 2570386). Для этого проводили обогащение бактерий опытных образцов в сконструированной нами ранее среде [6]. Далее производили пересев на плотные питательные среды (ППС), в качестве которых использовали висмут-сульфитный агар (ВСА) и ксилозо-лизин-дезоксихолатный агар (XLD-агар). После инкубации при 37° С микробиологической петлей вновь пересевали микроорганизмы с типичных для сальмонелл колоний на скошенный мясо-пептонный агар (МПА)

для дальнейшей биохимической идентификации и серологической типизации. Кроме того, проводили опытные и контрольные исследования с неинфицированной сальмонеллами мясной продукцией, чтобы исключить вероятность ложноположительных результатов испытаний.

Результаты исследований и обсуждение

Проводя интерпретацию результатов, учитывали, что сальмонеллы могут формировать колонии на ВСА и XLD-агаре более 24-х часов, поэтому инкубацию посева материала на ППС осуществляли в течение 48-ми часов. При культивировании отмечена морфологическая идентичность между колониями опытных и контрольных образцов: все пробы дали характерный рост. Колонии бактерий рода *Salmonella* на XLD-агаре имели черный центр и слегка прозрачную зону красноватого цвета. На ВСА используемые в работе штаммы сальмонелл образовывали

черные с характерным металлическим блеском или зеленые колонии. Единственным существенным отличием между культуральными свойствами контрольных и опытных образцов явилось время колониеобразования. В частности, нами отмечено более быстрое формирование колоний в опытных образцах по сравнению с контрольными (табл. 1). Сальмонеллы контрольных и опытных образцов обладали типичными биохимическими и серологическими свойствами.

Общее время исследований, включая этапы обогащения, формирования колоний, биохимической идентификации и серологической типизации, в опыте составило 63,0 часа, а в контроле – 90,0 часов (табл. 2).

Из таблицы 2 видно, что чувствительность разработанного способа индикации сальмонелл выше, чем классического анализа. При внесении в образец по 10 МТ сальмонелл и эшерихий в опыте были обнаружены *Salmonella* spp. за 71,4±5,06 часа, на иссле-

Таблица 1.

Рост колоний сальмонелл на плотных питательных средах

Серотип сальмонелл	Просмотр чашек Петри			
	через 24±3 часа		через 48±3 часа	
	опыт	контроль	опыт	контроль
XLD-агар				
<i>S. Typhimurium</i>	+++	++	+++	+++
<i>S. Dublin</i>	++	+	+++	++
<i>S. Choleraesuis</i>	+	-	+	+
<i>S. Enteritidis</i>	+	-	++	++
<i>S. Gallinarum-Pullorum</i>	++	-	++	++
<i>S. Infantis</i>	++	+	+++	++
<i>S. Hamburg</i>	++	+	+++	++
<i>S. Virchow</i>	+++	+	+++	++
ВСА				
<i>S. Typhimurium</i>	+++	++	+++	+++
<i>S. Dublin</i>	+	-	++	+
<i>S. Choleraesuis</i>	-	-	+	-
<i>S. Enteritidis</i>	+	-	++	+
<i>S. Gallinarum-Pullorum</i>	+++	++	+++	++
<i>S. Infantis</i>	+++	+	+++	++
<i>S. Hamburg</i>	+++	++	+++	++
<i>S. Virchow</i>	+	+	++	++

Примечание: +++ обильный рост; ++ несколько колоний; + единичные колонии; - отсутствие роста.

дование контрольных образцов потребовалось на 18,6 часов больше времени, и в итоге лабораторных испытаний не зафиксирован рост искомым микроорганизмов. Аналогичный результат получили при посевной дозе по 100 МТ *Salmonella* spp. и *E. coli*. В частности, обнаружение бактерий рода *Salmonella* в опытных образцах продукции продолжалось в течение $70,2 \pm 3,80$ часов, и был достигнут положительный результат, а в контрольных $90,0 \pm 0,0$ часов при отрицательном итоге исследований.

Заключение

С применением модифицированного метода изучения антагонистической активности бактерий Плитовым И. С. (2012) установлено, что биологически активные вещества, продуцируемые изолятами *E. coli*, угнетают рост бактерий рода *Salmonella*. Действительно, при попытке выделить сальмонеллы из ассоциации с эшерихиями (при посевной дозе по 10 и по 100 МТ в соотношении 1:1) классическим бактериологическим анализом были получены отрицательные результаты. Однако обогащение испытуемых образцов в сконструированной среде привело к угнетению БГКП и способствовало детекции сальмонелл.

При искусственной контаминации образцов в дозе от 1000 до 100 млрд. МТ *Salmonella* spp. и *E. coli* как в опыте, так и в контроле были получены положительные результаты исследования. Однако на испытания контрольных образцов мясных продуктов оказалось затрачено в 1,5-2 раза больше времени, чем на анализ опытных проб.

Таким образом, продолжительность лабораторных испытаний контрольных образцов составила от трех до шести дней, а опытных - всего до трех дней. Также необходимо отметить, что внесение в исследуемые мясные продукты только эшерихий в количестве по 10 МТ/образец не привело к получению ложноположительных результатов испытаний как при работе с разработанной средой, так и при использовании стандартного бактериологического анализа.

Список литературы

1. Белик, С. Н. Гигиеническая характеристика пищевой ценности и безопасности мяса и шпика свиней, выращенных с использованием белково-витаминно-минеральной добавки фирмы "Провими": дисс. ... канд. мед. наук [Текст] / С. Н. Белик. – Ростов-на-Дону, 2005. – 214 с.
2. Мезенцев, С. В. Распространение сальмонелл в продукции животноводства [Текст] / С. В. Мезенцев // Практик. – 2010. – № 2. – С. 6–11.

Таблица 2.

Результат исследования мясных продуктов, искусственно контаминированных *Salmonella* spp. в ассоциации с *E. coli*

Количество внесенных сальмонелл и <i>E. coli</i> , МТ/см ³	Опыт		Контроль	
	время, час	результат	время, час	результат
10 ¹	71,4±5,06 ¹	положительный	90,0±0,0	отрицательный
10 ²	70,2±3,80 ¹	положительный	90,0±0,0	отрицательный
10 ³	70,2±3,80 ¹	положительный	135,6±5,80	положительный
10 ⁴	69,0±0,0 ¹	положительный	133,2±3,79	положительный
10 ⁵	69,0±0,0 ¹	положительный	124,8±6,20	положительный
10 ⁶	69,0±0,0 ¹	положительный	121,2±3,79	положительный
10 ⁷	69,0±0,0 ¹	положительный	120,0±0,0	положительный
10 ⁸	69,0±0,0 ¹	положительный	120,0±0,0	положительный
Контроль на отсутствие ложноположительного результата (0 МТ салым. 10 МТ <i>E. coli</i>)	63,0±0,0 ¹	отрицательный	90,0±0,0	отрицательный

¹ При P<0,001.

3. Нитяга, И. М. Повышение эффективности выявления *L. monocytogenes* и энтерогеморрагических *E. coli* в мясе и мясных продуктах : дисс. ... канд. биол. наук [Текст] / И. М. Нитяга. – Москва, 2004. – 127 с.

4. Плитов, И. С. Этиологическая структура сальмонеллеза и эшерихиоза птиц : автореферат дисс. ... канд. вет. наук [Текст] / И. С. Плитов. – Москва, 2012. – 25 с.

5. Тулякова, Т. В. Безопасность продовольственного сырья - важная составляющая безопасности пищевых продуктов [Текст] / Т. В. Тулякова, Н. А. Фурсова, Е. И. Шибанов // Пищевая промышленность. – 2013. – № 5. – С. 33.

6. Чугунова, Е. О. Сравнительный анализ сред для неселективного обогащения сальмонелл [Текст] /

Е. О. Чугунова, Н. А. Татарникова, О. Г. Мауль // Вестник ветеринарии. – 2015. – № 75. – С. 51–54.

7. Яремчук, П. В. Некоторые вопросы сдачи-приемки живого скота [Текст] / П. В. Яремчук // Мясные технологии. – 2010. – № 2 (86). – С. 34–38.

8. Burnett, S. L. Survival of *Salmonella* in peanut butter and peanut butter spread [Текст] / S. L. Burnett [et al.] // J. Appl. Microbiol. – 2000. – Vol. 89 (3). – P. 472–477.

9. Doyle, M. P. Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers [Текст] / M. P. Doyle, L. R. Beuchat // Washington: ASM Press, 1997. – 1038 p.

10. Olsen, S. J. Multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium infection from milk contaminated after pasteurization [Текст] / S. J. Olsen [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 10. – P. 932–935.

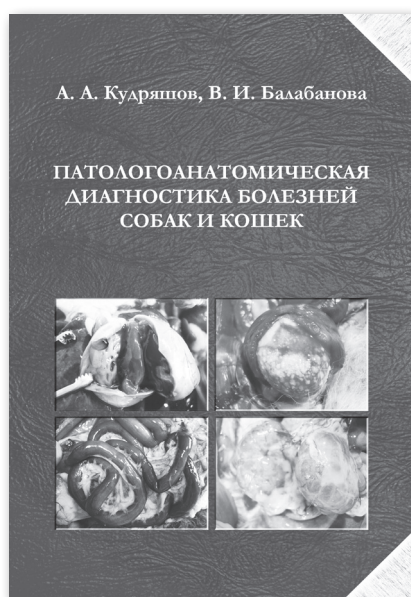
Патологоанатомическая диагностика болезней собак и кошек

Авторы: Кудряшов А. А.,
Балабанова В. И.

Формат: 170 x 250 мм, твёрдый переплет, 328 с. с илл.

Описание: В книге представлены рекомендации по проведению и протоколированию вскрытия мелких домашних животных и в частности собак и кошек, а также материалы по патологоанатомической и дифференциальной диагностике большинства инфекционных и наиболее важных инвазионных и незаразных болезней. Из незаразных болезней разобраны те, которые наиболее часто приводят к смерти и в диагностике которых определяющее значение имеют результаты вскрытия.

Впервые представлены данные по патологоанатомиче-



скому описанию отравлений собак ИЗОНИАЗИДОМ, ЦИАНИДАМИ И КРЫСИННЫМИ ЯДАМИ, а также представлена информация по патогенезу данных отравлений.

Текст иллюстрирован авторскими снимками органов с патологоанатомическими изменениями при ряде болезней.

В книгу включены снимки препаратов и рисунков музея кафедры патологической анатомии Санкт-Петербургской государственной академии ветеринарной медицины.

Книга предназначена для ветеринарных специалистов и студентов ветеринарных факультетов вузов.

Допущено Министерством сельского хозяйства Российской Федерации в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности «Ветеринария».

Заказ книги: т. 8 (812) 232-88-61, E-mail: ivb-info@mail.ru ; invetbio@yandex.ru; через сайт <http://invetbio.spb.ru/Kudryashov-2016.htm> Код заказа П10

22-25 ИЮНЯ

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
ЭКСПОФОРУМ

ЗООНЕДЕЛЯ

БЕЛЫЕ НОЧИ



22-24
ИЮНЯ

ЗООСФЕРА

МЕЖДУНАРОДНАЯ ВЫСТАВКА ТОВАРОВ
И УСЛУГ ДЛЯ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ

24-25
ИЮНЯ

**ВСЕ СОБАКИ
МИРА**

САСИБ-FCI «БЕЛЫЕ НОЧИ»
ВЫСТАВКА СОБАК, СПОРТ, ФЕСТИВАЛЬ ПОРОД

24-25
ИЮНЯ

ЗООШОУ

ВЫСТАВКА ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ



ОРГАНИЗАТОР

EXPOFORUM

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ
МЕДИАПАРТНЕР



САНКТ-ПЕТЕРБУРГ, ПЕТЕРБУРГСКОЕ ШОССЕ, 64/1

WWW.ZOOSHOW.EXPOFORUM.RU

WWW.ZOOSPHERE.EXPOFORUM.RU



ИТОГИ IX ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ «МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА – 2017»

С 18 по 20 апреля 2017 г. состоялась IX Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная Диагностика 2017», организаторами которой были НП «Национальное общество инфекционистов» и ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. Конференция проходит раз в три года и является главным научным событием в сфере молекулярной диагностики в России и странах СНГ.

В конференции «Молекулярная диагностика 2017» приняло участие более 2400 делегатов. В рамках мероприятия прошли 30 научных секций и 9 сателлитных симпозиумов, в которых выступили 230 докладчиков из 16 стран (Россия, Казахстан, Германия, США, Канада, Италия, Франция, Сенегал, Габон, Бельгия, Швеция, Сербия, Словения, Швейцария, Нидерланды, Австралия).

К открытию конференции был издан сборник трудов, куда вошли более 850 тезисов.

Доклады участников мероприятия были посвящены таким аспектам применения молекулярных методов диагностики, как:

- молекулярная диагностика вирусных гепатитов,
- ВПЧ-тестирование и профилактика рака шейки матки;
- современные направления онкогенетики и молекулярная диагностика в онкологии;
- инфекции с воздушно-капельным, контактно-бытовым механизмом передачи возбудителя и их осложнения;
- молекулярно-биологические методы в изучении инфекционной патологии желудочно-кишечного тракта;
- молекулярные методы в диагностике внутриутробных инфекций;
- современные подходы к молекулярной диагностике и эпидемиологический надзор за особо-опасными, природно-очаговыми, тропическими и протозойными инфекциями;
- современные подходы к молекулярной диагностике инфекций органов репродукции;
- технологии молекулярного анализа в криминалистике и судебной медицине;



- молекулярная диагностика в генетике моногенных и мультифакторных заболеваний;
- новые направления молекулярной диагностики ВИЧ-инфекции;
- диагностика вторичных заболеваний при ВИЧ-инфекции и других иммунодефицитных состояниях;
- методы молекулярного анализа в диагностике и эпидемиологии туберкулезной инфекции;
- фармакогенетика и фармакогеномика;



- молекулярная диагностика инфекционных болезней животных;

- контроль качества и безопасность продуктов питания; и многие другие.

В первый день конференции, на пленарном заседании, с ответственными словами выступили:

- Краевой Сергей Александрович - Заместитель Министра здравоохранения РФ;
- Кузькин Борис Петрович - заместитель Руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Также состоялся пресс-брифинг для журналистов профильных и федеральных общественно-политических СМИ, на котором выступили сотрудники ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора совместно с иностранными докладчиками конференции.

В выставке приняли участие 41 компания: ИнтерЛабСервис, Siemens, Генотек, Фонд «Сколково», Эппендорф Раша, InnovaSystem, БиоХимМак, Биомерье, Синтол, ДИАЭМ, ТДА-Восток, Скайджин, Квадрос-Био, Fractal Bio, Ниармедик и другие.

На конференции были представлены последние открытия отечественной и зарубежной науки в сфере молекулярной диагностики, тем самым мероприятие в очередной раз выступило в качестве главной площадки для обмена знаниями и технологиями между специалистами отрасли.



Даты проведения
27 - 29 сентября 2017 года



МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «БАЛТИЙСКИЙ ФОРУМ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ И ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ» 2017

МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ПО ВЕТЕРИНАРИИ МЕЛКИХ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ:

Мастер-класс по кардиологии: Dr. Gerhard Wess (Германия).

Дипломат ECVIM-CA (Internal Medicine), ACVIM (кардиология), ECVIM-CA (кардиология).

Руководитель службы кардиологии клиники мелких животных внутренней медицины, LMU университет Мюнхена, Германия. Основатель www.EKGSERVICE.de.

Исследования:

- Кардиомиопатии кошек - новая и текущая диагностика, терапия, генетическое тестирование.
- Кардиомиопатия доберманов - генетическое тестирование, новые и расширенная диагностика, исследования.
- Биомаркеры.
- Новые эхокардиографические методы: TVI, деформация, скорость деформации, 3D/4D УЗИ.
- Интервенционная кардиология.
- Исследования митрального клапана.

Мастер-класс по гематологии: Dr. Kamil Tomsa (Швейцария).

Доктор ветеринарной медицины.

Образование: Университет ветеринарии и фармацевтики, Брно, Чешская республика.

Постдипломное образование: Университет ветеринарии и фармацевтики, Отделение Радиологии, Брно, Чешская республика.

Практика: Университет Цюриха, Клиника мелких животных, Цюрих, Швейцария.

Ординатура: Июль 1996 – Декабрь 1996.

Университет Цюриха, Клиника мелких животных, Цюрих, Швейцария. Январь 1997 – Июнь 2001.

Университет штата Джорджия, Колледж ветеринарной медицины, отделение медицины мелких животных, Афины, штат Джорджия, США. Июль 2001 – Январь 2002.

Степень: Диплом Европейского Колледжа Ветеринарной Медицины – животные компаньоны.

Деятельность в настоящее время.

Частная практика: EnnetseeKlinik клиника мелких животных Хюненберг, Швейцария (Rothusstrasse 2b, 6331 H nenberg, Switzerland).

Темы для обсуждения на форуме: Инфекционные заболевания, вызывающие нарушения свертывания крови. Иммуноопосредованную тромбоцитопению, диагностика и управление. Иммуноопосредованную гемолитическую анемию, диагностика и управление. ДВС-синдром и др.

Мастер-класс по дерматологии: Белова Светлана (Эстония).

Практикующий ветеринарный врач, Дипломант Европейского Колледжа по Ветеринарной Дерматологии (DirECVD), лектор по дерматологии Эстонского Университета Естественных Наук.

Начиная с 1999 года ежегодно принимает участие в работе международных ветеринарных конгрессов, семинаров и мастер-классов. С 2005 года является лектором по дерматологии в Эстонском Аграрном Университете, обучая студентов старших курсов клинической дерматологии. С 2007 - 2011 прошла резидентуру по программе Европейского Колледжа Ветеринарной Дерматологии в Цюрихском Университете и, успешно сдав экзамен, стала дипломированным дерматологом. Член Европейского Общества Ветеринарных Дерматологов, член Международного Общества

Ветеринарных Дерматологов, член Эстонской Ветеринарной Ассоциации Мелких Животных. Активно участвует в последипломном образовании, принимая в клинике стажеров из России и Прибалтики, участвуя в конференциях и мастер-классах, организованных в Эстонии, Латвии, Литве, России, Украине, Белоруссии, Польше, Венгрии. Первые лекции по дерматологии прочитала в 2002 году в Латвии. На сегодняшний день подготовила и прочитала более 50 лекций и мастер-классов по дерматологии на русском, английском и эстонском языках. Профессиональные интересы – пациенты с atopическим дерматитом, гистопатология, клиническая фотография.

Албеско Анатолий (Россия).

Главный ветеринарный врач ООО «Сеть ветеринарных клиник»

Окончил Одесский государственный аграрный университет по специальности «Ветеринарная медицина» в 2003г. С 2008 года и по настоящее время ведет прием исключительно дерматологических пациентов.

Неоднократно принимал участие в Московском международном ветеринарном конгрессе, Киевском международном конгрессе специалистов ветеринарной медицины, международной Национальной ветеринарной конференции в городе Москва (NVC 2013), в том числе и в качестве докладчика.

Прочитал более 30 лекций по актуальным вопросам дерматологии мелких домашних животных и вопросам организации специализированного дерматологического приема в Москве, Санкт-Петербурге, Ростове, Киеве, Одессе, Севастополе, Симферополе, Львове, Днепропетровске и других городах. Является автором и соавтором ряда статей на дерматологическую тематику. Окончил Школу ветеринарной дерматологии врача дерматолога, «подводным камнем» в диагностике и лечении, необычных случаях и вопросам терапевтического сотрудничества.

Мастер-класс по хирургии: Dr. Marcel Keller (Швейцария).

Дипломат DECVS.

1988 - 1993 Факультет ветеринарной медицины, Университет Цюриха.

1994 - 1995 Практика мелких домашних животных, крупный репродуктивных животных.

1996 - 1999 Клиника хирургии мелких животных, анестезиология, Университет Цюриха.

2000 - 2003 Клиническая ординатура по хирургии мелких животных, кафедра хирургии мелких животных, Vetsuisse факультет Цюрихского университета - ветеринарный факультет (Vetsuisse-Fakultät) в Цюрихе относится к лучшим в Европе центрам ветеринарной медицины. Исследования которые проводятся на факультете: ветеринарная онкология, профилактика заболеваний животных, селекция. Кроме этого, исследования направлены также на защиту людей от последствий заболеваний животных, и охрану окружающей среды от возможного вреда, который может возникнуть в процессе хозяйственного использования животных.

2004 - 2005 доцент хирургии мелких животных, кафедра хирургии мелких животных, Vetsuisse факультет Цюрихского университета.

2005 - 2008 начальник хирургии, Kleintierklinik Rigiplatz, Cham, Швейцария.

Сентябрь 2008 - настоящее время начальник хирургии, Ennetsee Klinik für Kleintiere AG, Хюненберге, Швейцария.

Мастер-класс по репродукции собак:

научно-практический проект Центра Репродуктивной Биологии Управления ветеринарии СПб и ЗАО «Кантри» при участии специалистов польской компании Draminski, мирового лидера в производстве УЗИ сканеров для медицины и ветеринарии и создавших новое направление приборов для контроля половых циклов животных.

Место проведения: Санкт-Петербург, отель «Санкт-Петербург», Пироговская набережная 5/2

ПАРТНЕР ФОРУМА ГК «ВЕТПРОМ»

Контакты: сайт www.baltvetforum.ru, электронная почта: fondvet@yandex.ru

Телефоны: +7 921 953 55 74, +7 921 910 88 80

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ ЖУРНАЛА «АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ВЕТЕРИНАРНОЙ БИОЛОГИИ»

Важным условием для принятия статей в журнал «Актуальные вопросы ветеринарной биологии» является их соответствие нижеперечисленным правилам. При наличии значительных отклонений от них направленные материалы рассматриваться не будут. Оригиналы и копии присланных статей авторам не возвращаются. Материалы можно присылать по электронной почте: virclin@mail.ru. Электронный вариант статьи рассматривается как оригинал, в связи с чем авторам рекомендуется перед отправкой материалов в редакцию проверить соответствие текста на цифровом носителе распечатанному варианту статьи. Кроме того, материалы для публикации можно передать или переслать в редакцию по адресу: 197198, Россия, С.-Петербург, ул. Ораниенбаумская, д. 3-Б. Телефон для связи: (812) 232-55-92. Факс (812) 232-88-61.

Подготовка материалов

Статья может содержать до 10 машинописных страниц (18 тыс. знаков с пробелами), не считая рисунков, таблиц и списка литературы. Электронный вариант статьи должен быть подготовлен в виде файла в формате .doc для ОС Windows и содержать текст статьи и весь иллюстративный материал (фотографии, графики, таблицы) с подписями.

Таблицы и диаграммы должны быть выполнены в один цвет – черный, без фона.

Автор должен представить каждое изображение в отдельном файле в оригинальном размере (при обработке изображений в графических редакторах необходимо учесть, что для офсетной печати не подходят изображения с разрешением менее 300 dpi и размером менее 945 px по горизонтали).

Текст статьи должен быть набран шрифтом Times New Roman, 12 пт, без форматирования (стиль «Обычный»). Нумерованные и нумерованные списки формируются без применения автоформатирования (вручную) с использованием арабских цифр или символа «-» соответственно.

В статье желательно использование не более 3–5 нетрадиционных сокращений для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте. Эти сокращения вводятся в круглых скобках после первого полного названия термина. В тех случаях, когда используемая аббревиатура узаконена международной классификацией, ее следует использовать в соответствующей транскрипции. Например, для сокращения термина «интерлейкин» должна быть использована аббревиатура в соответствии с международной номенклатурой «IL», а не русскоязычный вариант «ИЛ»; «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Запрещается вводить какие-либо сокращения в название статьи. Названия микроорганизмов должны быть приведены в оригинальной транскрипции и наклонным шрифтом (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения должны быть приведены без точки после их сокращенного обозначения (см, мл, г, мг, kDa и т. д.). При использовании условных обозначений следует иметь в виду, что в процессе подготовки журнала к верстке символы, полученные с использованием нетипичных шрифтов (α , β , γ и пр.), а также некоторые специальные символы форматирования (\bullet , \rightarrow , \Leftrightarrow , ...) могут неверно интерпретироваться.

При изложении материала следует придерживаться стандартного построения научной статьи:

1. Введение.
2. Материалы и методы.
3. Результаты исследований.
4. Обсуждение результатов.
5. Заключение (выводы).
6. Список литературы.

Статья должна представлять собой законченное исследование.

Заключение (выводы) должно быть четким, конкретным, вытекать из результатов и обсуждений результатов исследования и соответствовать цели работы и поставленным задачам.

Ссылки на первоисточники расставляются по тексту в цифровом обозначении в квадратных скобках. Номер ссылки должен соответствовать цитируемому автору.

Цитируемые авторы располагаются в разделе «Список литературы» в алфавитном порядке (российские, затем зарубежные). Представленные в «Списке литературы» ссылки должны быть полными, и их оформление должно соответствовать действующему ГОСТу. Количество ссылок должно быть не более 10 – для оригинальных статей, 30 – для обзоров литературы.

К материалам статьи также обязательно должен быть приложен 1 экземпляр сопроводительного письма на имя главного редактора журнала «Актуальные вопросы ветеринарной биологии» Чуваева И. В. Письмо должно содержать:

1. Фамилию, имя, отчество каждого автора статьи с указанием названия учреждения, где работает автор, его должности, научных степеней, званий и контактной информации на русском языке.

2. Фамилию, имя, отчество каждого автора статьи с указанием названия учреждения, где работает автор, его должности, научных степеней, званий и контактной информации на английском языке.

3. Фамилию, имя, отчество автора, ответственного за дальнейшую переписку с указанием предпочтительного способа связи.

4. Полное название статьи на русском языке.

5. Название статьи на английском языке.

6. Аннотацию статьи на русском языке (800–1200 печатных знаков). Аннотация не должна включать в себя название статьи и общих фраз, например: «В статье представлены данные о влиянии поваренной соли на продуктивность носорогов»... Аннотация должна отражать цель исследования, основные и конкретные результаты исследования с представлением цифровых данных. Сокращения в аннотации не допустимы.

7. Аннотацию статьи на английском языке (summary). Аннотация на английском языке должна быть корректным переводом (НЕ КОМПЬЮТЕРНЫЙ ПЕРЕВОД) аннотации на русском языке.

8. УДК.

9. Ключевые слова (до 5) на русском языке.

10. Ключевые слова на английском языке.

11. Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.

12. Дату отправки материалов.

13. Подписи всех авторов.

Авторские права

Подаявая статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы. Авторы согласны с автоматическим переходом их авторских прав к журналу «Актуальные вопросы ветеринарной биологии» в момент принятия статьи к печати. С этого момента весь приведенный в статье материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением являются: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии.

Оплата за публикацию статей

При соблюдении всех вышеперечисленных правил рецензирование статьи и ее публикация в журнале «Актуальные вопросы ветеринарной биологии» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за большое количество иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций), за публикацию цветных иллюстраций, 2) за размещение рекламной информации; 3) при повторной подаче материала в редакцию, в случае если статья (по результатам рецензирования) была отправлена автору на доработку.

Рецензирование статей

Все материалы, подаваемые в журнал, проходят рецензирование согласно «Правилам рецензирования научных статей», согласованным с ВАК при Минобрнауки России.

По результатам рецензирования редакция журнала принимает решение о возможности публикации данного материала.

ПОДПИСКА НА ЖУРНАЛ «АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ВЕТЕРИНАРНОЙ БИОЛОГИИ»

Подписной индекс в каталоге «Газеты. Журналы» – 33184, «Пресса России» – 29447.

Юридические и физические лица, желающие получать наш журнал постоянно, могут оформить подписку непосредственно в редакции журнала (Санкт-Петербург, ул. Ораниенбаумская, д. 3-Б) или по e-mail (virclin@mail.ru): направьте бланк заказа (в произвольной форме, с точным почтовым адресом получателя с индексом и контактным телефоном для уточнения информации) и копию документа об оплате. Журнал подписчикам доставляется заказной бандеролью Почтой России.

Стоимость подписки на 2017 г. (4 номера): для юридических и физических лиц – 1 600 руб., для подписчиков из ближнего зарубежья – 1 800 руб.

Юридические лица для получения счета на оплату подписки и других необходимых документов могут обращаться по телефонам: (812) 232-55-92, 927-55-92 или по e-mail: invetbio@yandex.ru.

Физические лица могут оплатить стоимость подписки:

1) в любом банке (для получения образца заполненной квитанции обращайтесь по e-mail: invetbio@yandex.ru);

2) через платежную систему Яндекс-деньги: счет для оплаты 41001182195695 (в сообщении следует указать: «Подписка на "АВВБ-2017"», Ф.И.О. и почтовый адрес).

Полная информация о подписке на журнал – на сайте www.invetbio.spb.ru/journal/vb_podpiska.htm.

ПРИОБРЕТЕНИЕ ЖУРНАЛА «АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ВЕТЕРИНАРНОЙ БИОЛОГИИ»

Вы можете заказать любой из предыдущих номеров журнала по т.: (812) 927-55-92 или по e-mail: virclin@mail.ru, и мы вышлем Вам его заказной бандеролью. Стоимость 1 экз. журнала выпуска до 2015 г. – 400 руб., 2015 г. – 500 руб., 2016 г. – 600 руб., (без учета почтовых расходов).

Кроме того, Вы можете заказать (virclin@mail.ru) доставку отдельной статьи (+ содержание журнала и 1-я страница обложки журнала) по e-mail в сканированном виде. Стоимость сканирования и электронной пересылки 1 статьи – 300 руб. Статья пересылается после получения оплаты.

АРТРОГЛИКАН (ARTROGLYCAN)

хондропротектор нового поколения, геронтологический препарат для собак, кошек, хорей, крыс

Выпускается в форме таблеток по 0,7 г. В состав препарата входят: глюкозамина гидрохлорид (100 мг); хондроитина сульфат (200 мг); витамин Е (20 мг); селенометионин (50 мг); органическая форма кальция (100 мг).

Фармакологическое действие

Артрогликан обладает хондропротекторным, умеренно анальгезирующим, противовоспалительным действиями, антиоксидантной активностью; укрепляет стенки капилляров.

Препарат стимулирует процессы регенерации и замедляет дегенерацию хрящевой ткани; способствует восстановлению суставной сумки и хрящевых поверхностей суставов; улучшает подвижность суставов; участвует в построении основного вещества костной и хрящевой ткани. Артрогликан участвует в синтезе протеогликанов и гиалуроновой кислоты, стимулирует образование хондроитинсерной кислоты, нормализует отложение кальция в костной ткани.

Препарат препятствует развитию дегенеративно-дистрофических изменений в сердечной мышце и скелетной мускулатуре; обладает гепатопротекторными свойствами.

Артрогликан восполняет дефицит витамина Е, кальция и селена.

Показания

Дегенеративные заболевания суставов и позвоночника, первичный артроз, межпозвонковый остеохондроз, остеоартрит, остеоартроз, спондилез, остеопороз, дисплазия суставов. Для улучшения качества жизни собак, кошек, крыс и хорьков старшей возрастной группы. Дополнительная информация: www.invetbio.spb.ru/farma/artroglycan.htm

Заказ Артрогликана

в Екатеринбурге: ЗАО «Уралбиовет», т. (343) 345-34-34, 345-34-37, 345-34-38;

в Тюмени: ЗАО «Айболит», т. (3452) 33-58-65, 33-97-81;

в Москве: ООО «АС-Маркет», т. (498) 696-00-10; ООО «ЗооВетКом», т. +7 926 369-70-55; ЗАО «ВетИмпэкс», т. (495) 786-97-81, 786-97-82; ООО «ВЕТМАРКЕТ», т. (495) 777-60-81, 777-61-06; ООО «Торговый Дом «Гама-Маркет», т. (499) 190-72-41;

у производителя (от одной банки/пачки): ООО «Биоцентр «ЧИН», т. + 7 921 350-92-53; e-mail: invetbio@mail.ru

