

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.

Корректор

Суховой Д. А.

Журнал основан в 2009 г.

Учредитель и издатель:
ЧОУДПО «Институт
Ветеринарной Биологии»

ФИЗИОЛОГИЯ

Олешкевич А.А., Комарова С.А., Шевкопляс В.Н.
Анализ физиологических особенностей производных кожи биофизическими методами 3

ЭМБРИОЛОГИЯ

Кузьмина Т.И., Чистякова И.В.
Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезёма на апоптоз в нативных и девитрифицированных клетках гранулёзы *Bos taurus* 8

ГЕНЕТИКА

Мукий Е.В., Нестеренко Е.С.
Особенности разведения мансовых полозов в домашних условиях 13

ИММУНОЛОГИЯ

Рустамов Р.Д., Трофимов О.В., Пак И.В.
Оценка влияния дрожжевой добавки на показатели иммунологического статуса сельскохозяйственных животных 19

Суворова Т.А., Пронина Г.И., Микряков Д.В., Петрушин А.Б.
Состав лейкоцитов периферической крови и иммунокомпетентных органов краснухоустойчивой породы карпа в конце нагульного периода 25

ПАРАЗИТОЛОГИЯ

Беспалова Н.С., Золотых Т.А.
Гематологический статус у собак, больных дирофиляриозом 30

Каменов К.С., Шинкаренко А.Н.
Циркуляция возбудителя дифиллоботриоза на территории Волгоградской области 35

Логина О.А., Кузнецов Ю.Е., Белова Л.М., Ширяева В.А.
Копрологическая диагностика гельминтозов полудиких животных: источники ошибок первого и второго рода 42

ЭПИЗООТОЛОГИЯ

Дрошнев А.Е., Завьялова Е.А., Булина К.Ю.
Микробиологический мониторинг возбудителей инфекционных болезней лососевых рыб в Северо-Западном регионе 47

ФАРМАКОЛОГИЯ

Володина В.В., Барина В.В., Менькова А.В., Сакетова К.Ш., Гнучева В.И., Яковлева Е.П., Лушникова А.А.
Поиск эффективных средств против сапролегниоза икры осетровых рыб 53

Никанорова А.М.
Сравнительная овоцидная и ларвицидная активность препаратов на основе s-фенвалерата и пиперонилбутоксиды в форме полимерного материала и раствора на основе цифлутрина на яйцах, личинках и нимфах иксодовых клещей вида *Ixodes ricinus* in vitro 64

ТОКСИКОЛОГИЯ

Ронк Б.О., Ермилов И.В.
Определение пестицидов методом газовой хроматографии в подморе медоносных пчел после летальной интоксикации 69

ГИСТОЛОГИЯ

Денисова В.В., Файрушина А.И., Хисматуллина З.Р., Сартдинова И.И.
Влияние дефицита тестостерона на морфологию и количество астроцитов миндалевидного комплекса мозга крыс с абсанс-эпилепсией 79

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ АНАТОМИЯ

Балабанова В.И., Кудряшов А.А.
Патоморфологические изменения при лавсонииозе у откормочных свиней 83

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 31.08.2019. Дата выхода: 06.09.2019. 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, 2019

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.,
Dr. Vet. Sci., Professor
Andreeva N. L.,
Dr. Biol. Sci., Professor
Belova L. M.,
Dr. Biol. Sci., Professor
Kudryashov A.A.,
Dr. Vet. Sci., Professor
Kontsevaya S. U.,
Dr. Vet. Sci., Professor
Kuzmin V. A.,
Dr. Vet. Sci., Professor
Panin A.N.,
Dr. Vet. Sci., Professor,
Member of RAS
Prudnikov V. S.,
Dr. Vet. Sci., Professor
Suleymanov S. M.,
Dr. Vet. Sci., Professor
RF Honoured Worker of Science
Vasilyev D. B.,
Dr. Vet. Sci.
Voronin V. N.,
Dr. Biol. Sci., Professor
Yashin A. V.,
Dr. Vet. Sci., 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

PHYSIOLOGY

Oleshkevich A.A., Komarova S.A., Shevkoplyas V.N.
Analysis of the physiological features of skin derivatives by biophysical methods 3

EMBRYOLOGY

Kuzmina T.I., Chistiakova I.V.
The effect of highly dispersed silica nanoparticles on apoptosis in native and devitrified
Bos taurus granulosa cells 8

GENETICS

Mukiy Yu.V., Nesterenko E.S.
Breeding characteristics of corn snakes at home 13

IMMUNOLOGY

Rustamov R.D., Trofimov O.V., Pak I.V.
Assessing the influence of yeast additive on the immunological status parameters
of farm animals 19

Suvorova T.A., Pronina G.I., Mikryakov D.V., Petrushin A.B.
Composition of leukocytes of peripheral blood and immunocompetent organs
of red sustainable breed of carp in the feeding period 25

PARASITOLOGY

Bespalova N.S., Zolotykh T.A.
Gematological status of dogs with dirofilariasis 30

Kamenov K.S., Shinkarenko A.N.
Circulation of tapeworm disease of causative agent on the territory of Volgograd region 35

Loginova O.A., Kuznetsov Yu.Ye., Belova L.M., Shiryayeva V.A.
Coprological diagnostics of helminthoses in semiwild animals: type I and type II error sources 42

EPIZOOTOLOGY

Droshnev A.E., Zavyalova E.A., Bulina K.Yu.
Microbiological monitoring of viruses of salmonid fishes in the North-West region 47

PHARMACOLOGY

**Volodina V.V., Barinova V.V., Men'kova A.V., Saketova K.Sh., Gnucheva V.I.,
Yakovleva E.P., Lushnikova A.A.**
The search of effective agents against saprolegniosis of sturgeon eggs 53

Nikanorova A.M.
Comparative ovocidal and larvicidal activity of preparations based on s-fenvalerate
and piperonylbutoxide in the form of a polymeric material and a solution based
on cyfluthrin on eggs, larvae and nymphs of ixodid mites *Ixodes ricinus* in vitro 64

TOXICOLOGY

Roik B.O., Ermilov I.V.
Determination of pesticides by gas chromatography in the corpses of honey bees
after lethal intoxications 69

HISTOLOGY

Denisova V.V., Fayrushina A.I., Khismatullina Z.R., Sartdinova I.I.
The effect of testosterone deficiency on the morphology and quantity of astocytes of the brain's
amygdala of rats with absence epilepsy 79

PATHOLOGICAL ANATOMY

Balabanova V.I., Kudriashov A.A.
Pathomorphological changes in lawsoniosis from fattening pigs 83

Publishing of Institute of Veterinary Biology

Address of the editorial office/publisher: 197198, St.-Petersburg, Oranienbaumskaaya 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 31.08.2019. Issue date: 06.09.2019. 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, 2019

DOI: 10.24411/2074-5036-2019-10030

УДК 612.112

Ключевые слова: волосы, идентификация, поляризационно-интерференционная микроскопия, спектрофотометрия, окислительно-восстановительный потенциал

Keywords: hair, identification, polarization-interference microscopy, spectrophotometry, redox potential

А.А. Олешкевич, С.А. Комарова, В.Н. Шевкопляс

**АНАЛИЗ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ПРОИЗВОДНЫХ КОЖИ
БИОФИЗИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ**
*ANALYSIS OF THE PHYSIOLOGICAL FEATURES OF SKIN DERIVATIVES
BY BIOPHYSICAL METHODS*

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии —
МВА имени К.И. Скрябина» (ФГБОУ ВО МГАВМиБ — МВА имени К.И. Скрябина)
109472, Россия, г. Москва, ул. Ак. Скрябина, 23
*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Moscow State Academy
of Veterinary Medicine and Biotechnology — MVA by K. I. Skryabin» (Moscow SAVMB)
109472, Russia, Moscow, Scriabin St., 23*

Олешкевич Анна Анатольевна, профессор кафедры информационных технологий,
математики и физики, доктор биологических наук; доцент.

E-mail: kompsotita@gmail.com. Тел. +7(495)377-72-66

*Anna Anatol'evna Oleshkevich, Professor of the Department of Information Technologies, Mathematics and Physics,
Doctor of Biological Sciences. E-mail: kompsotita@gmail.com. Tel.: +7(495)377-72-66*

Комарова Светлана Алексеевна, старший преподаватель кафедры информационных технологий,
математики и физики. E-mail: kaffizmgavmib@mail.ru

*Svetlana Alekseevna Komarova, Senior Lecturer, Department of Information Technologies, Mathematics and Physics.
E-mail: kaffizmgavmib@mail.ru*

Шевкопляс Владимир Николаевич, проректор по науке, доктор ветеринарных наук; профессор.

E-mail: shevkoplyasvn@gmail.com. Тел.: (495) 377-63-50

*Vladimir Nikolaevich Shevkoplyas, Vice-Rector for Science, Doctor of Veterinary Sciences; Professor.
E-mail: shevkoplyasvn@gmail.com. Tel.: +7 (495) 377-63-50*

Аннотация. Для определения физиологических особенностей кожи животных разного вида была изучена возможность применения следующих биофизических методов: поляризационно-интерференционной микроскопии, флуоресцентной микроскопии, ультрафиолетовой (УФ) спектрофотометрии, редокс-метрии. В качестве образцов были взяты волосы разного цвета, формы, длины и толщины от животных различных классов, семейств и видов. Полученные спектры поглощения ультрафиолетового излучения имеют характерные различия в полосах поглощения волос не только разных классов, семейств и видов животных, но и возрастные и половые отличия. Фрактальный анализ микрофотографий волос животных провели в программном пакете «HarFA». Были построены уравнения регрессии, соответствующие графики и гистограммы. Значение фрактальной размерности также было индивидуально для кожи разных видов животных. Результаты редоксометрии показали, что редокс-потенциалы различны для производных кожи животных разных видов.

Summary. To determine the physiological characteristics of the skin of animals of different types, the possibility of using the following biophysical methods was studied: polarization-interference microscopy, reflected light microscopy, fluorescence microscopy, ultraviolet (UV) spectrophotometry, redox-metry. Hair samples of various colors, shapes, lengths and thicknesses from animals of various classes, families and species were taken. The UV-spectra absorption obtained have characteristic differences not only in the absorption bands of hair different classes, families and species of animals, but also age and sex differences. A fractal analysis of micrographs of animal hair was performed in the HarFA software package. Regression equations, the corresponding graphs and histograms were built. The values of the fractal dimension were also individual for the skin of different species of animals. The results of redoxometry showed that the redox potentials are different for skin's derivatives from animals of different types.

Введение

В силу способности к адаптации к различным природным условиям, кожа и её производные могут сильно отличаться по химическому составу даже у близких видов животных. Основными составными компонентами волос являются кератин и меланин, которые по строению отличны от меланина кожного покрова. Высокое содержание серосодержащих аминокислот в составе кератинов шёрстного покрова является их отличительной особенностью. До настоящего момента основными методами исследования кожного покрова и производных кожи – волос – являются [5] световая микроскопия в проходящем свете нативных волос или продуктов их неполного гидролиза (дисков). Изучение специфических особенностей волос может нести диагностическую ценность, в связи с тем, что волосы всех видов животных отличаются полиморфностью структуры. Актуальность работы обусловлена необходимостью проведения исследования нативных волос и их щелочных гидролизатов при помощи наиболее простых, быстрых в постановке и современных биофизических методов, а также опробовать возможности программного пакета «HarFA 5.1» для анализа микрофотографий волос с целью создания в перспективе лабораторной тест-системы.

Материалы и методы

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К. И. Скрябина». Для определения видовой принадлежности волос животных применяли следующие биофизические методы: поляризационно-интерференционная микроскопия, флуоресцентная микроскопия, ультрафиолетовая (УФ) спектрофотометрия, а также редокс-метрия. В качестве образцов были намеренно отобраны волосы с холки животных различных классов, семейств и видов. Образцы волос для лабораторного анализа были разного цвета, формы, длины и толщины. Источниками для исследования служила шерсть следующих животных:

– Овца домашняя – *Ovis orientalis aries*, каракульская порода, Россия, 2 самки и 2 самца.

– Северный олень – *Rangifer tarandus*, 2 самца и 2 самки, Россия, о. Серебрякова.

– Лисица серебристо-черная, клеточного разведения – *Vulpes vulpes*, 3 самца и 3 самки, Россия, Московская область.

– Коза – *Capra*, 4 самки и 5 самцов, Россия.

Поляризационно-интерференционную микроскопию проводили при помощи микроскопа «BIOLAR» с одной двупреломляющей призмой: увеличение 600×; объективы – х 40, А = 0,4, Т = 160. Проведение термохимического гидролиза волос с распадом на диски и люминесцентной микроскопии (увеличение 400×; объектив ×40, окуляр 10 /18) осуществляли по ранее отработанной авторами методике [3]. Фотографирование результатов микроскопии осуществляли цифровой камерой-окуляром для микроскопа «SCOPETEK», модель DCM35.

Спектры и полосы поглощения щелочных гидролизатов волос животных в связи с присутствием в кератинах серосодержащих (цистин) и ароматических (триптофан, тирозин) аминокислот анализировали в УФ-области спектра. Спектрофотометрию проводили [2] в кварцевых кюветах объёмом 3 мл на спектрофотометре СФ-46. Измеряли спектры поглощения при длинах волн от 240 до 600 нм, через каждые 5 нм. Образцом сравнения (контролем) служил 10%-ный раствор NaOH.

Окислительно-восстановительный потенциал растворов (редокс-метрия) измеряли в условиях термостатирования (+24°C) с помощью обычного лабораторного рН-метра (типа ЭВ-74), настроенного как милливольтметр, с помощью двух электродов: измерительного и вспомогательного. Регистрировали ЭДС от датчика. Перед измерением гидролизаты инкубировали 6 дней в темноте. Для измерений брали по 1 мл гидролизата каждого образца.

Фотографии, полученные при микроскопии волос, анализировали при помощи программного пакета «HarFA 5.1».

Результаты исследований и обсуждение

Проведённое предварительное исследование образцов волос всех видов животных в отражённом свете практически не дало диагностически значимых результа-

тов для идентификации [3]. Было получено несколько изображений, но в подавляющем большинстве случаев структура сердцевинки просматривалась слабо. По результатам проведённой люминесцентной микроскопии все образцы волос можно условно разделить на три группы: люминесцирующие, слабо люминесцирующие и не люминесцирующие совсем [3]. Методом поляризационно-интерференционной микроскопии (Рис. 3) все образцы просматривались хорошо, можно было идентифицировать строение сердцевинки. УФ-спектрофотометрия, на наш взгляд, может быть отнесена к перспективным методам лабораторной экспертизы. Полученные на спектрофотометре СФ-46 спектры имеют характерные различия в полосах поглощения волос разных классов, семейств и видов животных. Например, полученные результаты показали, что щелочные гидролизаты волос взрослых коз (самок и самцов) начинают поглощать свет при 245–275 нм. В идентифицированном спектре присутствуют две полосы поглощения: 410–510 нм и 550–650 нм. Щелочные гидролизаты из шерсти новорождённых коз не поглощают ультрафиолетовое излучение при длинах волн 275–285 нм и 300–350 нм. Растворы щелочных гидролизатов из волос беременных коз не поглощали диапазон длин волны от 300 до 370 нм. Полосы поглощения щелочных гидролизатов волос оленя, лисы и овцы лежат в УФ-части спектра 220–345 нм и имеют по два экстремума: в начале и в конце выявленного диапазона. Особенности в положениях минимумов и максимумов и, соответственно, отличия в оптической плотности щелочных гидролизатов шерсти различных видов млекопитающих, доказывают различие в строении и составе кератинов.

При проведении исследования методом редокс-метрии учитывали, что изменение редокс-потенциала волос под действием света обусловлено соотношением сульфгидрильных (SH) и дисульфидных (SS) групп [1, 5]. Полученные данные редокс-потенциалов показали, что они различны не только для разных видов животных. Редокс-потенциал шерсти оленя составил минус 3,75±0,16; шерсти лисы — минус 17,5±0,7; шерсти

овцы — минус 7,5± 0,4. Однако при выявленных существенных различиях в абсолютных значениях показателей, окислительно-восстановительной потенциал достоверно менялся как после облучения растворов светом, так и после инкубации образцов в темноте.

В программном пакете «HarFA» с шагом фрактальной размерности 0.01 провели фрактальный анализ изображений волос жи-

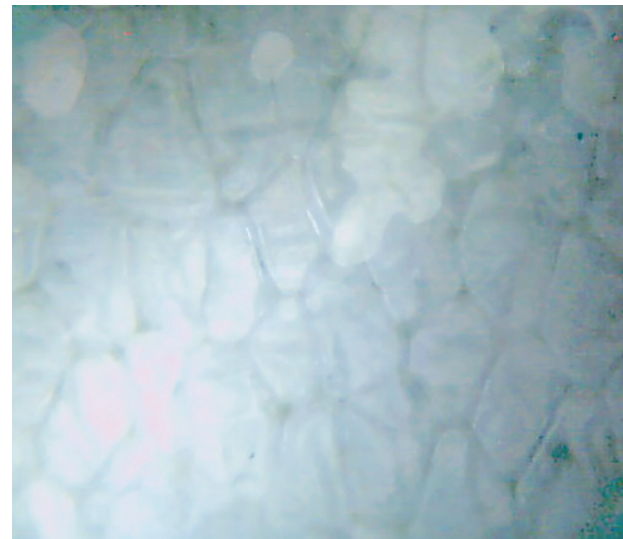


Рис. 1а. Микрофотография волоса северного оленя (люминесцентная микроскопия, увеличение 400х).

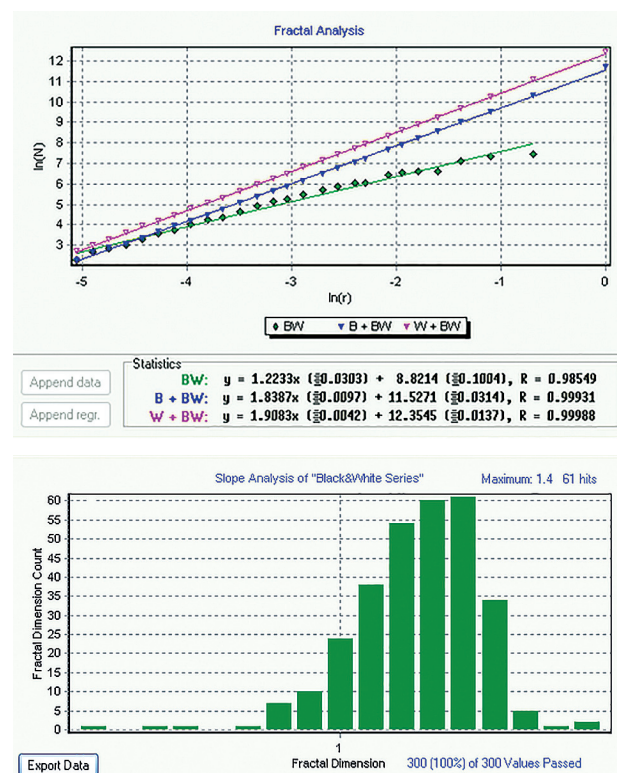


Рис. 1б. Фрактальный анализ микрофотографии волоса северного оленя. А — графики и уравнения регрессии. Б — гистограмма.

вотных по методу А. А. Олешкевич с соавторами [4]. Были получены уравнения регрессии, построены соответствующие графики и гистограммы (Рис. 1–3).

Анализ (Рис. 1–3) выявляет изменения в структуре волоса, позволяя получить важную и достоверную информацию для диагностики. На рисунках отчётливо видна фрактальная структура анализируемого объекта, а также отражены их видовые различия в гистограммах и коэффициентах фрактальной

размерности. Материалом для дальнейшей интерпретации являются получаемые графики с коэффициентами фрактальной размерности (в комбинациях BW и B+BW) при максимальной корреляции R и минимальном коэффициенте дисперсии и представление результатов в виде дискретной или непрерывной формы отображения информации. Сравнение гистограмм (вида, сдвига) и значений фрактальной размерности D (для образцов шерсти разных видов животных от $y = 1,0594$ до $y = 1,5339$,

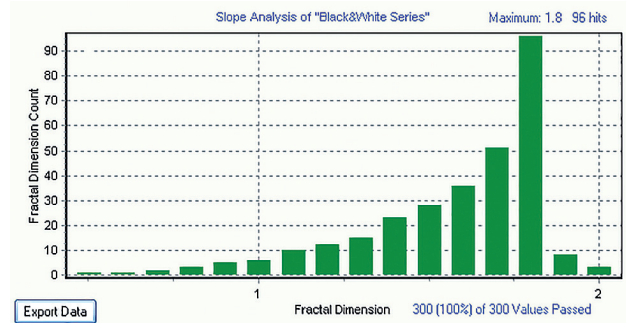
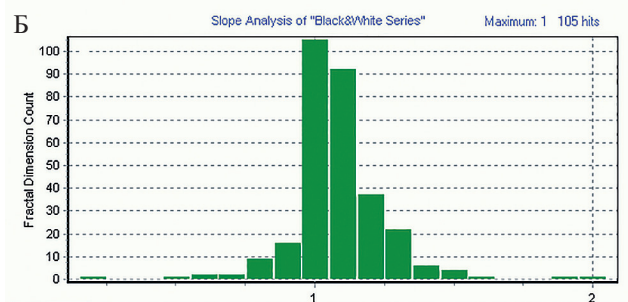
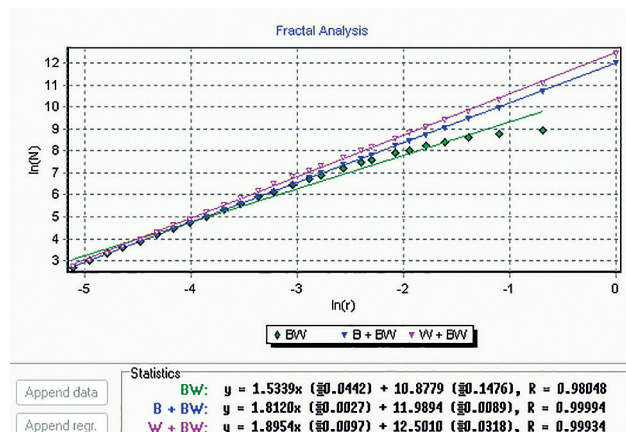
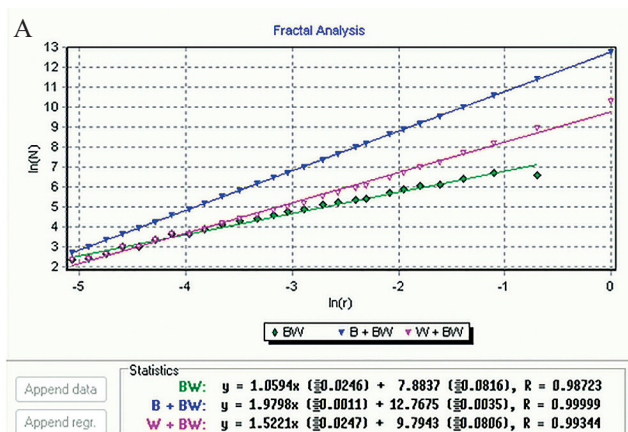
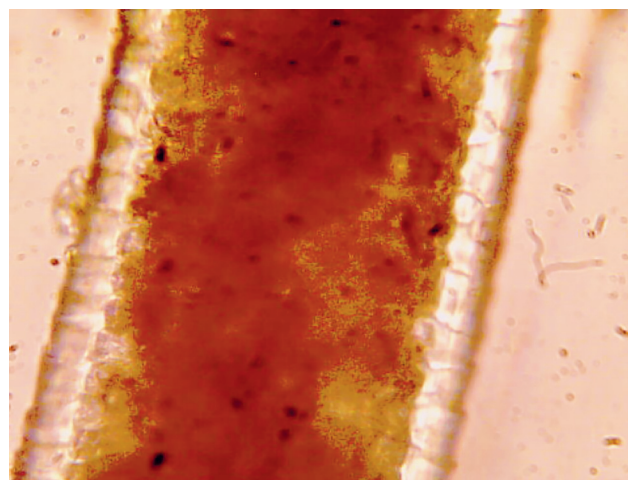
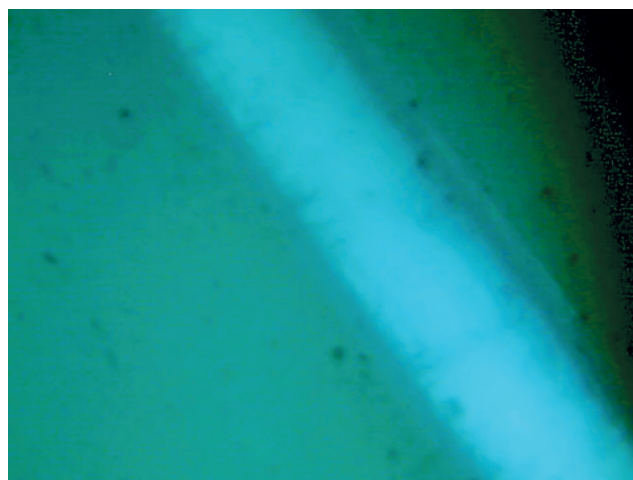


Рис. 2. Микрофотография (люминесцентная микроскопия, увеличение 400x) и фрактальный анализ микрофотографии волоса лисы. А — графики и уравнения регрессии. Б — гистограмма.

Рис. 3. Микрофотография волоса овцы (съемка в поляризационно-интерференционном микроскопе; увеличение 600x) и фрактальный анализ изображения.

рис. 2 и 3 — графики) позволяет сделать вывод об отсутствии самоподобия исследуемых объектов с эталонными образцами сравнения, и как следствие, говорить об обнаружении наличия видовых особенностей объектов экспертизы. До наших исследований фрактальный анализ волос и шерсти животных не проводили [4, 6–8]. При сборе достаточного банка данных для волос животных разного вида и возраста можно по изменению фрактальной размерности микрофотографий определять не только основные физиологические характеристики кожи и её производных, но и принадлежность шерсти.

Сопоставление данных анализа волос методом флуоресцентной микроскопии с результатами фрактального анализа показывает большую информативность сочетания методов лабораторных исследований с методами математической нелинейной динамики.

Заключение

Для определения физиологических особенностей кожи животных разного вида максимально информативно сочетание нескольких биофизических методов: редокс-метрии, фрактального анализа, поляризационно-интерференционной микроскопии и ультрафиолетовой спектрофотометрии. Указанные виды микроскопии выявляют отдельные черты микроструктуры волос животных, но не позволяют определить физиологических особенностей производных кожи. Полученные спектры поглощения ультрафиолетового излучения имеют характерные различия в полосах поглощения волос не только разных классов,

семейств и видов животных, но и возрастные и половые отличия. Использование метода математической нелинейной динамики показало, что значения фрактальной размерности индивидуально для производных кожи разных видов животных. Результаты редоксометрии подтвердили выявленные закономерности.

Список литературы

1. Бульга Л. П. Исследование животных близких видов в практике судебной экспертизы. / Л. П. Бульга. 1980. – 123 с.
2. Комарова С. А. Изучение щелочных гидролизатов волос млекопитающих методом спектрофотометрии. / С. А. Комарова // Материалы Международной школы-семинара «Физика в системе высшего и среднего образования России». / М.: АПР, 2015. С. 128–130.
3. Комарова С. А., Олешкевич А.А., Максимов В.И. Биофизические методы определения видовой принадлежности шерсти / С. А. Комарова, А. А. Олешкевич, В. И. Максимов // Научное обозрение. 2015. № 22. С. 10–16.
4. Патент РФ на изобретение № 2640177. Способ определения степени влияния физических факторов на биологические объекты / А. А. Олешкевич, А. М. Носовский, Э. М. Комарова. — Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений РФ 29.06.2017 г.
5. Чернова О. Ф. Архитектоника и диагностическое значение коры и сердцевины волос / О. Н. Чернова // Известия РАН. 2004. №1. С. 73-83. (Биология)
6. Шишкин, Е. И. Моделирование и анализ пространственных и временных фрактальных объектов / Е.И. Шишкин. Екатеринбург: Уральский государственный университет, 2004. 88 с.
7. Щепин, Е. В. О фрактальных кривых Пеано / Е. В. Щепин // Труды МИАН. 2004. Т. 247. С. 294–303.
8. Zmeskal O. Fractal Analysis of Image Structures / O. Zmeškal, M. Veselý, M. Nežádal, M. Buchniček // HarFA — Harmonic and Fractal Image Analysis (2001), pp. 3–5.

Объективная проверка слуха у животных. ВАЕР тест

С 2018 года ЧОУ ДПО "Институт Ветеринарной Биологии" проводит обучающий курс по объективной проверке слуха у животных, проведению ВАЕР-теста у собак, кошек и других видов животных. Курс включает в себя теоретическую и практическую программы. В теоретической части занятий, слушатели знакомятся с теорией процесса регистрации вызванных слуховых потенциалов и основами нейрофизиологии. За время практических занятий каждый курсант обучается самостоятельно проводить осмотр животного перед проведением ВАЕР теста, проверять племенные документы (для выписки сертификата допуска в разведение) непосредственно выполнять ВАЕР тест, фиксировать данные тестирования, интерпретировать данные тестирования, выписывать экспертное заключение о результатах ВАЕР теста. По окончании курсов слушатели, прошедшие итоговое испытание, получают СЕРТИФИКАТ СПЕЦИАЛИСТА по проведению ВАЕР теста.

Курс рассчитан на практикующих ветеринарных врачей. На курсах организована продажа книг по ветеринарии. Вы можете забронировать интересующие вас издания через форму на сайте, а оплатить и получить заказ в первый день занятий. Место проведения: Санкт-Петербург, ул. Ораниенбаумская, д. 3, лит. Б, ЧОУ ДПО "Институт Ветеринарной Биологии" (схема проезда)

Предварительная регистрация обязательна! Для регистрации на данный курс необходимо прислать заявку в свободной форме на адрес E-mail: virclin@mail.ru

DOI: 10.24411/2074-5036-2019-10031

УДК 636.2:612.621

Ключевые слова: гранулёза, витрификация, апоптоз, *Bos taurus*, наночастицы высокодисперсного кремнезема
Keywords: *granulosa*, *vitrification*, *apoptosis*, *Bos taurus*, *highly dispersed silica nanoparticles*

Кузьмина Т. И., Чистякова И. В.

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ВЫСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЁМА НА АПОПТОЗ В НАТИВНЫХ И ДЕВИТРИФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ ГРАНУЛЁЗЫ *BOS TAURUS*

THE EFFECT OF HIGHLY DISPERSED SILICA NANOPARTICLES ON APOPTOSIS IN NATIVE AND DEVITRIFIED BOS TAURUS GRANULOSA CELLS

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста»

Адрес: 196625, РФ, Санкт-Петербург – Пушкин, Московское шоссе, 55а.

All-Russian researcher Institute of genetics and breeding of farm animals is a branch of Federal state budget scientific institution “Federal scientific center for animal husbandry – VIZH named after of academician L. K. Ernst”

Address: 196625, Russia, St. Petersburg – Pushkin, Moscow highway, 55a.

Кузьмина Татьяна Ивановна, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией биологии развития, главный научный сотрудник. E-mail: prof.kouzmina@mail.ru. Тел.+7(921)3921947.

Kuzmina Tatiana Ivanovna, Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Developmental Biology, Chief researcher, E-mail: prof.kouzmina@mail.ru. Tel. +7(921) 3921947.

Чистякова Ирэна Валерьевна, младший научный сотрудник лаборатории биологии развития.

E-mail: itjere7@gmail.com. Тел.+7(952) 3506144.

Chistiakova Irena Valeryevna, Junior researcher of Laboratory of Developmental Biology

E-mail: itjere7@gmail.com. Tel. +7(952) 3506144.

Аннотация. Использование кокультуры или монослоя клеток гранулёзы овариальных фолликулов животных в клеточных репродуктивных технологиях обусловлено их большой значимостью при росте и созревании ооцитов *in vivo*. Сохранность клеток гранулёзы после обработки сверхнизкими температурами (витрификация) детерминирует «качество» среды для культивирования ооцит-кумулясных комплексов. В настоящем исследовании в сравнительном аспекте проанализированы апоптотические процессы (TUNEL-тест) в нативных и девитрифицированных клетках гранулёзы из фолликулов *Bos taurus*. При использовании наночастиц высокодисперсного кремнезема (ВДК, концентрация 0,001 %) в составе криопротекторных и культуральных сред доля апоптотических клеток в популяции девитрифицированных гранулезных клеток через 24 и 48 часов культивирования снизилась с 61 до 38 %, $P < 0.001$, и с 78 до 45 %, $P < 0.001$, соответственно. Таким образом, анализ результатов проведенных экспериментов выявил положительный эффект наночастиц ВДК на статус хроматина нативных и девитрифицированных клеток гранулёзы коров при пролонгированном культивировании, что позволяет рекомендовать использование наночастиц ВДК при витрификации и культивировании соматических и половых клеток овариальных фолликулов.

Summary. The usage of co-culture or monolayer of granulosa cells from ovarian animal follicles in cellular reproductive technologies is due to their great importance in growth and maturation of oocytes *in vivo*. The safety of granulosa cells after treatment by ultra-low temperatures (vitrification) determines the “quality” of medium for culture of oocyte-cumulus complexes. In the present study, the apoptotic processes (TUNEL test) in native and devitrified granulosa cells from the follicles of *Bos taurus* were analyzed in a comparative aspect. In case of use of highly dispersed silica (HDS, concentration – 0.001 %) nanoparticles in cryoprotective and cultural media, the proportion of apoptotic cells in the population of devitrified granulosa cells after 24 and 48 hours of culture decreased from 61 to 38 %, $P < 0.001$ and from 78 to 45 %, $P < 0.001$, respectively. So the analysis of experimental results revealed a positive effect of HDS nanoparticles on the chromatin status of native and devitrified bovine granulosa cells during the prolonged culture, which implies the use of HDS nanoparticles for vitrification and culture of somatic and germ cells of ovarian follicles.

Введение

Интенсификация фундаментальных исследований в области физиологии женской гаметы млекопитающих определяется необходимостью совершенствования инновационных клеточных репродуктивных

и ДНК-технологий (получение эмбрионов *in vitro*, клонирование, трансгенез, редактирование генома) [9]. В основе вышеперечисленных технологий лежит метод созревания донорских ооцитов *in vitro*. Несмотря на значительные успехи в технологии экстракорпо-

рального созревания ооцитов коров, выход развившихся из них эмбрионов на протяжении многих лет составляет не выше 40% [7]. Одной из важнейших задач технологии экстракорпорального созревания и оплодотворения – создание системы культивирования, адекватно отражающей условия формирования гамет *in vivo*. Известно, что использование кокультуры клеток гранулезы при созревании донорских ооцитов *in vitro* значительно повышает выход эмбрионов на стадии бластоцисты [6]. Ядра клеток гранулезы используются в качестве донорских в технологии клонирования [8]. Фундаментальные исследования стероидогенеза подразумевает долгосрочное культивирование гранулезных клеток, а использование клеток гранулезы в качестве тест-системы цито- и генотоксичности различных реагентов обуславливает использование культуры этих клеток в фармакологии. Понятно, что хранение, в том числе и долгосрочное (криоконсервация) клеток гранулезы, с сохранением их жизнеспособности позволит значительно повысить эффективность вышеперечисленных биотехнологий и сопутствующих им методов. Определяющую роль в технологии витрификации клеток играют состав криопротекторов.

Высокодисперсный кремнезём (ВДК) – аморфная форма диоксида кремния с размером частиц от 4 до 40 нм. Включение наночастиц ВДК (нВДК) в состав криопротекторных агентов может повысить эффективность витрификации за счет изменения свойств растворов, обусловленных структурой и свойствами высокодисперсного кремнезема. Ранее выявлено положительное воздействие наночастиц ВДК в концентрации 0,001 % на жизнеспособность декриоконсервированных сперматозоидов быков, развитие доимплантационных эмбрионов коров, свиней [1, 5]. Цель настоящего исследования – идентифицировать эффекты наночастиц ВДК на уровень апоптозов в нативных и девитрифицированных клетках гранулезы коров.

Материал и методы

Клетки гранулезы, использованные в экспериментах, были выделены из антральных фолликулов яичников коров диаметром 3–6 мм, с высоким тургором и обширной

васкуляризацией. Взвесь клеток обрабатывали тремя растворами криопротекторов (КПА), приготовленными на среде ТС-199 с 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС, NuClone, Logan, UT). КПА-1: 0.7 М диметилсульфоксид (ДМСО) + 0.9 М этиленгликоля (ЭГ); КПА-2: 1.4 М ДМСО + 1.8 М ЭГ; КПА-3: 2.8 М ДМСО + 3.6 М ЭГ + 0.65 М трегалозы. В каждый раствор криопротекторов вносили по 0,001 % нВДК. Осадок клеток гранулезы после отмыва в фосфатно-солевом буфере поэтапно экспонировали в течение 3 мин в КПА-1, затем в КПА-2 и 5 минут в КПА-3. Перед каждой обработкой растворами криопротекторов клетки центрифугировали при 300 об/мин в течение 60 секунд при комнатной температуре. Криопробирки с заключительной порцией осадка клеток гранулезы помещали в жидкий азот.

В процессе размораживания пробирки, содержащие витрифицированные клеточные осадки, помещали в водяную баню (37°C) и инкубировали в течение 120 с. Затем клетки поэтапно помещали в три раствора с различными концентрациями трегалозы, приготовленными на основе ТС-199: 0,25 М на 3 минуты, затем отмывали в 0,19 М (3 минуты), и далее в 0,125 М трегалозе (3 минуты), окончательно дважды отмывали в ТС-199 с 10 % ФБС. Каждый этап отмывания включал 60-секундное центрифугирование при 300 об/мин. Культивирование клеток проводили при температуре 38,5°C в атмосфере, содержащей 5 % CO₂ в течение 48 часов в среде следующего состава: ТС199 + 10 % фетальной бычьей сыворотки + 50 нг/мл пролактина, 10 мкг/мл гентамицина [3]. Концентрация клеток гранулезы составляла 10⁶ клеток гранулезы на мл среды. В опытные группы сред для культивирования добавляли наночастицы 0,001 % ВДК (марка А200°C, институт химии поверхности им. Чуйко, НАН Украины). В отборе концентраций руководствовались указанными разработчиками [2].

Аналізу клеток на апоптоз подвергали нативные клетки гранулезы (до культивирования), нативные клетки гранулезы, обработанные и необработанные нВДК (контроль 1 и 2), девитрифицированные клетки грануле-

зы, обработанные и необработанные нВДК (опыт 1 и 2). Определение апоптозов в гранулезе, проводили перед культивированием через 24 и 48 часов в следующей последовательности. Клетки гранулезы помещали на покрытые poly-L-lysine предметные стекла и подсушивали на воздухе. Далее проводили фиксацию в растворе формалина в течение 30 минут и промывание в фосфатно-буферном растворе (ФБР). Затем клетки выдерживали в течение 2 минут в 10 % растворе Тритона X –100 на 0,1 % цитрате натрия и повторно отмывали в ФБР. Затем экспонировали клетки с реактивом TUNEL (Kit from Boehringer Mannheim Cat.No.1684795) и инкубировали в темноте в течение 60 минут при 37°C. После инкубации клетки промывали в растворе ФБР и экспонировали в растворе пропидиума иодида (1 мг/мл), и вновь промывали в ФБР, оставляли в темноте при комнатной температуре на 1 час, затем помещали в холодильник и хранили в горизонтальном положении. Образцы анализировали при помощи флуоресцентного микроскопа Carl Zeiss Axio Imager A 2m.

Результаты обрабатывали с помощью статистической программы Sigma Stat. Все использованные в исследовании реагенты, за исключением обозначенных, производства фирмы Sigma-Aldrich. Пластиковая лабораторная посуда фирмы BD Falcon™. Досто-

верность различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости: $P < 0.05$; $P < 0.01$; $P < 0.001$ для 3-5 независимых экспериментов с помощью критерия χ^2 .

Результаты исследований

Исследования проводили в соответствии со схемой, представленной на рисунке 1.

Введение наночастиц ВДК в состав криопротекторных и культуральных сред способствовало снижению доли клеток в состоянии апоптоза на всех этапах культивирования, так, после замораживания/оттаивания в контрольных девитрифицированных (необработанных наночастицами ВДК) клетках доля апоптотических клеток достигла 51 % против 33 % в опыте (рис. 2, $P < 0.001$).

Уровень апоптозов через 24 часа культивирования в контрольных нативных клетках составил 22 %, в опытных – 15 %, в контрольных девитрифицированных клетках выше обозначенный показатель составил 61 % против 38 % в опытной группе (рис. 3, $P < 0.001$).

В девитрифицированных клетках гранулёзы доля апоптотических клеток значительно превышало таковую в нативных клетках на всех исследованных временных промежутках (24 часа: контроль – 22 % против 61 %; опыт – 15 % против 38 %; 48 часов: контроль

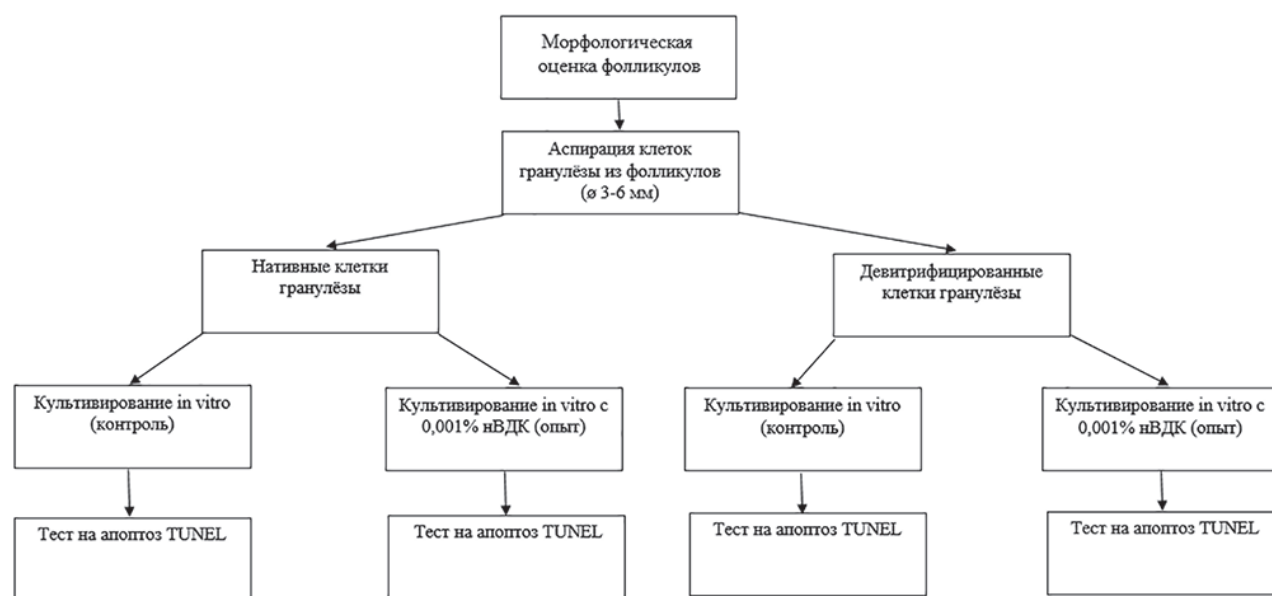


Рис. 1. Структурно-логическая схема экспериментов.

33 % против 78 %; опыт – 21 % против 45 %, $P < 0.001$, рис. 2–4).

На рис. 4 представлены результаты анализа деструктивных процессов в нативных и девитрифицированных клетках гранулёзы через 48 часов культивирования. Использование наночастиц ВДК в составе криопротекторных и культуральных сред обеспечило снижение уровня апоптозов, как в нативных, так и в девитрифицированных клетках. В нативных клетках через 48 часов культивирования уровень апоптозов составил 33 % (контроль) против 21 % (опыт), а в девитрифицированных ооцитах снизился с 78 % (контроль) до 45 % (опыт), $P < 0.001$.

Обсуждение

Использование кокультуры или монослоя клеток гранулёзы овариальных фолликулов животных в клеточных репродуктивных технологиях обусловлено их большой значимостью при росте и созревании ооцитов *in vivo*. Гранулёза – продуцент стероидов, вовлеченных в приобретение ооцитом компетентности к оплодотворению и формированию эмбрионов. Кроме того, гранулезные клетки участвуют в реализации эффектов многих гипофизарных гормонов при культивировании *in vitro* [6]. Понятно, что сохранность клеток гранулёзы после обработки сверхнизкими температурами в значительной степени обеспечит «качество» среды для культивирования женских гамет. Ранее в наших исследованиях выявлены положительные эффекты наночастиц ВДК на сохранность нативных клеток гранулёзы свиней, что выражалось в снижении уровня апоптозов

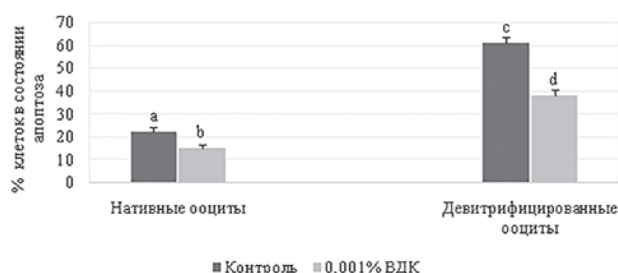


Рис. 3. Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезема на уровень апоптоза в нативных и девитрифицированных клетках гранулёзы овариальных фолликулов коров (24 часа культивирования, TUNEL-test). Достоверность сравниваемых значений (критерий χ^2): a;c; a;d; b;c; b;d; c;d $P < 0.001$.

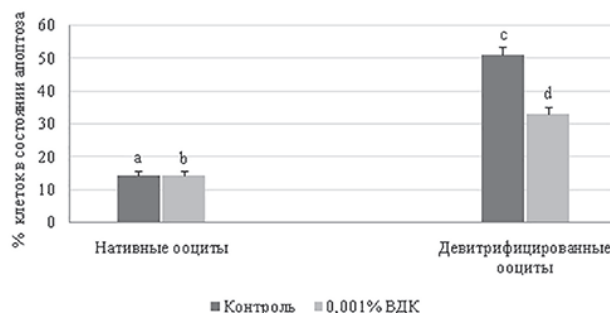


Рис. 2. Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезема на уровень апоптоза в нативных и девитрифицированных клетках гранулёзы овариальных фолликулов коров (TUNEL-test). Достоверность сравниваемых значений (критерий χ^2): a;c; a;d; b;c; b;d; c;d $P < 0.001$.

(метод проточной цитофлуориметрии), увеличении количества жизнеспособных клеток и снижении доли клеток с пикнотическими ядрами [4]. В настоящем исследовании в сравнительном аспекте проанализированы деструктивные процессы (апоптоз) в нативных и подвергшихся воздействию сверхнизких температур (витрификация) клетках гранулёзы коров до и после культивирования при введении в состав криопротекторных и культуральных сред наночастиц ВДК. В целом анализ результатов проведенных исследований выявил положительный эффект наночастиц ВДК на статус хроматина нативных и девитрифицированных клеток гранулёзы коров при их культивировании до 48 часов, что позволяет рекомендовать использование наночастиц ВДК в технологии экстракорпорального созревания ооцитов коров (время созревания гамет *in vitro* 24 часа). Увеличение количества жизнеспособных клеток обеспечит их функциональную активность и необходимую продукцию

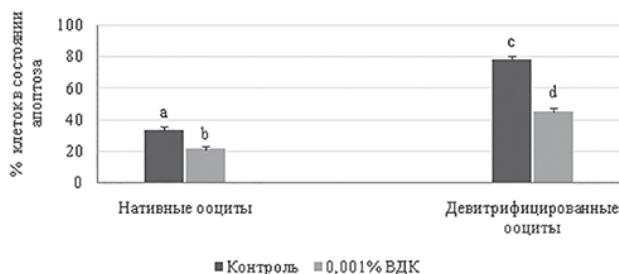


Рис. 4. Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезема на уровень апоптоза в нативных и девитрифицированных клетках гранулёзы овариальных фолликулов коров (48 часов культивирования, TUNEL-test). Достоверность сравниваемых значений (критерий χ^2): a;b $P < 0.01$; a;c; a;d; b;c; b;d; c;d $P < 0.001$.

биологически активных веществ, вовлеченных в процессы формирования яйцеклетки.

Заключение

Совершенствование клеточных репродуктивных технологий, базовой технологией которых является технология экстракорпорального созревания ооцитов *in vitro*, зависит от создания унифицированных методов культивирования половых и соматических клеток овариальных фолликулов, создания систем созревания с использованием структурных компонентов фолликулов и, прежде всего, гранулёзы. Модернизация сред культивирования и этапов технологии витрификации с использованием наночастиц вызывает необходимость оценки характера их воздействия на клетки. В настоящем исследовании в результате воздействия наночастиц ВДК (концентрация 0,001 %) выявлены эффекты снижения уровня апоптоза в нативных и девитрифицированных клетках гранулёзы при пролонгированном культивировании до 48 часов, что свидетельствует о целесообразности их включения в состав криопротекторных и культуральных сред.

Работа выполнена в соответствии с темой Министерства образования Российской Федерации, номер госрегистрации – АААА-А18-118021590132-9.

Список литературы

1. Бойцева Е. Н. Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезема на апоптоз сперматозоидов *Bos*

taurus. / Е. Н. Бойцева, Н. В. Бычкова, Т. И. Кузьмина // Цитология, 2017, т. 59, № 5, с. 375–380.

2. Зюзюн А. Б. Застосування наноматеріалу в ембріогенетичній системі *in vitro* отримання ембріонів свиней / А. Б. Зюзюн, О. В. Щербак, О. С. Осипчук, С. І. Ковтун, В. В. Дзіцюк // Фактори експериментальної еволюції організмів. 2015. Т. 17. С. 164–168.

3. Кузьмина Т. И. Модернизация этапов технологии экстракорпорального созревания донорских ооцитов *Bos taurus* / Т. И. Кузьмина, А. В. Молчанов, Т. И. Станиславович, Д. Н. Татарская // Аграрный научный журнал. 2017. № 3. С. 9–14.

4. Кузьмина Т. И. Эффекты наночастиц высокодисперсного кремнезема на статус хроматина соматических клеток фолликулов свиней / Т. И. Кузьмина, Д. А. Новичкова, О. А. Епишко, И. В. Чистякова // Ветеринария. 2017, № 2. С. 43–45.

5. Чистякова И. В. Воздействие кремнийсодержащих соединений на развитие доимплантационных эмбрионов *Bos taurus* / И. В. Чистякова, Т. И. Кузьмина, Т. И. Станиславович, Т. Г. Хонина // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. СПб. 2018. С.105–108.

6. Heleil B. Involvement of Granulosa Cells in Realization of Prolactin Effects on the Developmental Competence of Bovine Oocytes Matured *in vitro* / B. Heleil, T. I. Kuzmina, H. Alm, O. Scotti, A. Tuchscherer, H. Torner // Journal of American Science. 2010, 6(9). P. 796–805.

7. Paul A. K. Vitrification of bovine matured oocytes and blastocysts in a paper container / A. K. Paul, Y. Liang, K. Srirattana, T. Nagai, R. Parnpai // Anim. Sci. J. 2018. V.89. 2. P. 307–315.

8. Park M. J. Effective oocyte vitrification and survival techniques for bovine somatic cell nuclear transfer / Park M. J. // Cell Reprogram. 2015. V.17(3). P. 199–210.

9. Soo-Young Y. Development of genome engineering technologies in cattle: from random to specific / Soo-Young Y., Ki-Young Y., Woo-Jae C., Goo J. // Journal of Animal Science and Biotechnology. 2018. 9:16.

Объективная проверка слуха у животных. ВАЕР тест

С 2018 года ЧОУ ДПО "Институт Ветеринарной Биологии" проводит обучающий курс по объективной проверке слуха у животных, проведению ВАЕР-теста у собак, кошек и других видов животных. Курс включает в себя теоретическую и практическую программы. В теоретической части занятий, слушатели знакомятся с теорией процесса регистрации вызванных слуховых потенциалов и основами нейрофизиологии. За время практических занятий каждый курсант обучается самостоятельно проводить осмотр животного перед проведением ВАЕР теста, проверять племенные документы (для выписки сертификата допуска в разведение) непосредственно выполнять ВАЕР тест, фиксировать данные тестирования, интерпретировать данные тестирования, выписывать экспертное заключение о результатах ВАЕР теста. По окончании курсов слушатели, прошедшие итоговое испытание, получают СЕРТИФИКАТ СПЕЦИАЛИСТА по проведению ВАЕР теста.

Курс рассчитан на практикующих ветеринарных врачей. На курсах организована продажа книг по ветеринарии. Вы можете забронировать интересующие вас издания через форму на сайте, а оплатить и получить заказ в первый день занятий. Место проведения: Санкт-Петербург, ул. Ораниенбаумская, д. 3, лит. Б, ЧОУ ДПО "Институт Ветеринарной Биологии" (схема проезда)

Предварительная регистрация обязательна! Для регистрации на данный курс необходимо прислать заявку в свободной форме на адрес E-mail: virclin@mail.ru

DOI: 10.24411/2074-5036-2019-10032

УДК: 636.082:598.115.31

Ключевые слова: разведение маисового полоза, генетика окрасов

Keywords: corn snake breeding, color genetics

Мукий Ю. В., Нестеренко Е. С.

**ОСОБЕННОСТИ РАЗВЕДЕНИЯ МАИСОВЫХ ПОЛОЗОВ
В ДОМАШНИХ УСЛОВИЯХ**
BREEDING CHARACTERISTICS OF CORN SNAKES AT HOME

ФГБОУ ВО Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины
Адрес: 196084, Россия, Санкт-Петербург, Черниговская ул., д. 5. Тел. 8 (812) 388-13-78

Saint-Petersburg State Academy of Veterinary Medicine,

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education

Address: 196084, Russia, Saint-Petersburg, Chernigovskaya str., 5. Tel. +7 812 388-13-78

Мукий Юлия Викторовна, к.б.н., доцент, доцент каф. ветеринарной генетики и животноводства.

E-mail: jul.ma2015@yandex.ru. Тел. +7 921 431-24-12

*Mukiy Yulia Viktorovna, PhD in Biological Sciences, Associate Professor, Associate Professor
of the Veterinary Genetics and Animal Breeding Dept. E-mail: jul.ma2015@yandex.ru. Tel. +7 921 431-24-12*

Нестеренко Елизавета Сергеевна, студентка 1-го курса. E-mail: liza.elista2016@yandex.ru. Тел. +7 921 444-51-58

Nesterenko Elizaveta Sergeevna, student of 1th course. E-mail: liza.elista2016@yandex.ru. Tel. +7 921 444-51-58

Аннотация. В статье рассмотрены основные биологические особенности маисового полоза, классификация, распространение и условия обитания, питания и размножения данного вида в дикой природе и правила содержания (размеры террариума, температурный режим и микроклиматические условия), кормления, разведения в домашних условиях. Подробно описаны окрасы и их классификация, встречающиеся у этих полозов. Проведен анализ наследования окрасов при спаривании пары маисовых полозов в возрасте 3-х лет: самка морфы STRIPE и самец морфы AMELANISTIC STRIPE. От данных змей получено 15 потомков (10 самцов и 5 самок) различных окрасов: один самец морфы STRIPE CUBE с генотипом **RrBb** (het amel poss het anery amel lavender hypo), один самец и три самки морфы AMELANISTIC STRIPE с генотипом **Rrbb** (poss het anery lavender hypo), два самца и самка морфы AMELANISTIC STRIPE CUBE **Rrbb** (poss het anery lavender hypo), два самца морфы ANERYTHRISTIC STRIPE **rrBb** (het amel poss het lavender hypo), две самки морфы STRIPE **RrBb** (het amel poss het lavender hypo), два самца и самка морфы SNOW STRIPE **rrbb** (poss het lavender hypo), что соответствует ожидаемому при менделевском расщеплении.

Summary. The present article reviews basic biological features of corn snakes, classification, distribution and habitat conditions, feeding and breeding this species in the wild and content rules (size of terrariums, temperature and microclimatic conditions), feeding and breeding at home. Colors which are found in these snakes and their classification are described in details. Analysis of color inheritance was performed when the pair of corn snakes at the age of 3 years old copulated. Fifteen descendants with different morphs were received from the female with STRIPE morph and the male with AMELANISTIC STRIPE morph. There are one male with STRIPE CUBE morph with genotype **RrBb** (het amel poss het anery amel lavender hypo), one male and three females with AMELANISTIC STRIPE morph with genotype **Rrbb** (poss het anery lavender hypo), two males and one female with AMELANISTIC STRIPE CUBE morph **Rrbb** (poss het anery lavender hypo), two males with ANERYTHRISTIC STRIPE morph **rrBb** (het amel poss het lavender hypo), two females with STRIPE morph **RrBb** (het amel poss het lavender hypo), two males and one female with SNOW STRIPE morph **rrbb** (poss het lavender hypo), which coincide with Mendel Law.

Введение

Маисовый полоз (*Pantherophis guttatus*) относится к классу: Пресмыкающихся (*Reptilia*), отряду: Чешуйчатых (*Squamata*), семейству: Ужеобразных (*Colubridae*) подсемейству: Настоящих ужей (*Colubrinae*), включающих около 699 видов в 100 родах, роду: *Pantherophis*, виду: Маисовый полоз. Он распространен в США от сосновых пу-

стошей штата Нью-Джерси и далее на юго-запад до штата Луизиана и южной оконечности Флориды. Большая по численности популяция обитает на всей территории Америки, а также в Мексиканских провинциях и на Каймановых островах. Номинативный подвид предпочитает сосновые леса на песчаных почвах, вырубках в дубняке, отмечен в гористой местности до 1850 м над уров-

нем моря. Этот подвид крупнее других и, для взрослых особей характерным является полудревесный образ жизни. Змеи данного вида относятся к ночным животным, предпочитая скрытный образ жизни [2].

Длина особей может достигать 1,2–1,5 метров. Самцы вырастают несколько меньше самок.

Рацион змей состоит из мелких грызунов, таких как мыши и крысы, однако, также они могут питаться мелкими птицами и их яйцами и летучими мышами. Спариваются полозы в природе с марта по май. Весной самка откладывает от 3-х до 28 продолговатых яиц, летом появляется вторая кладка. Вылупление происходит с июля по сентябрь. Молодняк достигает в длину 233–380 мм с массой 5,04–6,1 г. Половозрелыми особи становятся в возрасте от полутора до трех лет. Активный рост у змей длится до 3-х лет, змеи, обитающие в неволе, зачастую меньше диких особей (таблица 1).

В неволе маисовые полозы являются одними из наиболее распространенных видов змей. Основными преимуществами для содержания в неволе является их небольшой размер, легкость в уходе, отсутствие яда, спокойное поведение и очень разнообразная окраска. В неволе «крысиные» полозы живут от 10 до 20 лет и более. Взрослые особи содержатся в террариумах 70–80 литров с проточной вентиляцией, минимальный размер террариума 60x40x40 см без учета высоты светильника, в то время как более молодые полозы живут в меньших по объему серпентариях для избежания стресса, который возникает при длительных поисках укрытия и пищи. Молодые маисы питаются раз в 5–6 дней, по мере взросления периоды между кормлениями увеличивают до 10–14 дней, как для взрослых особей. Обязательным условием содержания является поддержание определенных температур. Оптимальной является $t+28^{\circ}\text{C}$ в среднем для теплого угла

террариума и до $+(23-24)^{\circ}\text{C}$ в холодном. Общий температурный фон желателен днем $+25^{\circ}\text{C}$, ночью $+(22-24)^{\circ}\text{C}$. В террариуме необходимо наличие кюветы с водой, а также одно-два укрытия произвольной формы. Следует поддерживать также достаточную влажность в террариуме (70–80 %), особенно во время линьки. Линька при нормальных условиях длится 6–9 дней, из которых половину времени занимает вход в линьку, ожидание линьки еще половину, сама линька происходит в течение 30 минут [2].

Репродуктивный возраст для самок составляет 3 года, для самцов 2 года. Перед спариванием обе особи «зимуются» преимущественно в январе-феврале, иногда позже. Зимуют змеи в тесных боксах 8–10 недель с постепенным уменьшением температуры до $+(10-12)^{\circ}\text{C}$. Спаривают полозов в марте-апреле, при этом самку подсаживают к самцу. Развитие яйцеклеток длится 36–38 дней в среднем, после чего самка откладывает от 4 до 24 яиц в зависимости от возраста змеи и ее морфы. Далее яйца помещаются в инкубатор на 60–65 дней, который заполнен специальным субстратом вермикулитом, в нем поддерживается температура $+(27-29)^{\circ}\text{C}$ и влажность 75–85 %. При нарушении температурного режима эмбрион может развиваться с различными нарушениями [2].

Окрас маисовых полозов варьирует в зависимости от территории обитания (локалитета) в дикой природе. Основными локалитетами являются: Carolina (Normal, Classic) соответственно-природная окраска, Alabama, Keys (природный гипомеланист, островная форма, ранее относившаяся к подвиду *rosacea*), Miami и Okeetee. Все дикие окрасы представляют собой оранжевую окраску с чёрными полосами, окружающими красные пятна, с разным соотношением цветов фона и пятен. Брюшная сторона тела имеет сетчатый бело-чёрный рисунок [3].

Таблица 1

Средние показатели роста и веса маисовых полозов [4]

1 день	1 мес.	6 мес.	1 год	2 года	3 года	более 3 лет
3-5 г	5-10 г	15-25 г	65-80 г	150-200 г	260-350 г	350-520 г
20-27 см	27-35 см	45-50 см	70-75 см	90-110 см	110-120см	115-150 см

Основные морфы маисового полоза [3,4]:

Доминантные:

- **Buf** – окрас взрослой особи варьирует от желто-коричневого до шоколадно-коричневого, цвет глаз светлее, чем у Normal, фон светлее седел.

- **Masque** – ген, влияющий на паттерн и распределение пигмента, приводит к частичному редуцированию головного рисунка, раздвигает шашки на брюшной стороне тела и образует полосу без шашек по всему брюху.

- **Tessera** – ген, влияющий на паттерн. Создает полосатый спинной рисунок и сломанный (тесселированный) боковой узор. Шашки могут быть как классическими, так и сбитыми, или отсутствовать вовсе. Полосы шире, чем у Stripe, тессера не имеет гипозэффекта.

- **Toffee** – окрас взрослой особи варьирует от коричневого до шоколадного цвета. Цвет глаз желто-коричневый. Границы седла размыты из-за насыщенной окраски фона.

Неполные доминантные:

- **Palmetto** – сложный по проявлению ген, блокирующий пигментное проявление на чешуе, оставляя хаотичные единичные «окошки» с пигментом, в которых он распределен неравномерно. В гетерозиготном состоянии проявляется как легкое специфичное осветление фона.

Рецессивные:

- **Amelanistic** (Amel, Albino) – ген, блокирующий образование меланина, змея имеет окрас различных оттенков красного и желтого, красные (альбиносные) глаза, шашки выпадают редко.

- **Anerythristic** (Anergy, Anergytype A) – ген, блокирующий эритрин, за счет чего змея имеет черно-коричневую окраску. Желтый пигмент в первой трети туловища, радужка светло-серая, шашки темно-коричневые.

- **Caramel** – ген гипозеритристик, понижающий количество красного пигмента и оставляет желтый. Серо-желтая основная окраска с карамельными седловыми пятнами.

- **Charcoal** (Anergy B) – анеристикс более выраженным анеритризмом, блокирующим почти полностью желтый пигмент. Черно-серые седла на сером фоне, более темные глаза.

- **Cinder** (Ashy, Z, Anergy C) – псевдоанеристик, перераспределяющий пигмент гипозеритристик. Основной фон серый, седла кирпичные.

- У гетерозигот слегка высветленный фон, увеличенное количество седел, создает эффект потертости краев. Змеи этой морфы часто имеют более утонченные черты и часто треугольное сечение тела.

- **Diffused** – ген, редуцирующий боковую структуру паттерна, размытый боковой рисунок и выравненный цвет седла и фона, «убирает» шашки с брюшной части тела. Усиливается влиянием гена Masque.

- **Dilute** – слабовыраженная разновидность гипомеланизма. Перераспределение пигмента приводит к эффекту легкой линьки, особенно выраженной у анериморф.

- **Hypomelanistic** – полиморфный ген, имеющий ряд аллельных вариаций, снижающих количество меланина.

- **-hypomelanist** – обычное снижение количества меланина. Доминируют оранжево-красные цвета.

- **-christmas** – гипомеланист с более выраженным красным цветом. Гипомеланизм канта более выражен (зеленовато-коричневый).

- **-strawberry** – кодоминантный к Hypomelanistic ген. Дает более красный окрас, чем гипомеланист.

- **Kastanie** (Chestnut) – полиморфный полиаллельный ген гипозеритрического типа (из Florida-Keys).

- **-kastanie** – оранжево-коричневые седла и аналогичный основной цвет.

- **-sunrise** – оранжево-красные цвета.

- **-orangethings** – ярко-оранжевые цвета.

- **Lava** (Huro C) – гипомеланист. Яркие красно-оранжевые цвета и сильно гипомеланная окантовка седла, характерные для морфы Okeetee седла.

- **Lavender** – сложный по проявлению ген. Цвет глаз: рубиновый, цвет фона серебристо-серый, желтый пигмент редуцирован. Полиморфен: цветовая вариация от темно-серого и коричневого до серого с персиково-фиолетовыми тонами.

- **Microscale** – ген, уменьшающий размер чешуи.

• **Motley Striped** – полиморфный рецессивный ген, изменяющий структуру седел, брюшная сторона тела без «шашек», имеет гипоэффект.

• **-motley** – кодоминантный к striped ген, удлиняет и иногда соединяет седла.

• **-striped** – изменяет паттерн седла в линии/полоски, вплоть до его исчезновения.

• **Scaleless** – ген, убирающий чешую полностью или частично (оставляя на брюшной стороне тела).

• **Sunkissed** (Нуро В) – яркий гипомеланист, происходящий из морфы Okeetee. Имеет окитные седла. Преобладают желто-оранжевые цвета. Уникально влияет на другие морфы: в motley отсутствуют «связанные» седла, седла уменьшены, овальной формы, в striped седла вытянутой овальной формы, на брюшной части тела могут располагаться шашки. При сочетании генов Cinder и Sunkissed паттерн разбит на мелкие черточки, а Tessera с Sunkissed делает проявление гена Tessera не таким упорядоченным.

• **Terrazzo** – создает полосатый (сломанный) узор, чередование полос может перейти в хаотичный рисунок, на брюшной части тела нет шашек. Истоки морфы – Florida-Keys.

Ultra – ген гипомеланизма гибридного происхождения, кодоминантный к Амел [3, 4].

Дикий тип или генотип нормального маисового полоза может быть представлен как “**R-B-**”. **R** обуславливает красную окраску, и **B** – черную. Маисовые полозы, у которых отсутствует черный пигмент (**bb**) – это амеланисты (amelanistic). Когда отсутствует красный (**rr**) – анеретристы (anerythristic). И с отсутствием пигмента – называются сноу (snow) – генотип **rrbb** [6].

Материал и методы

Материалом для исследования послужили самка и самец маисового полоза, а также 15 их потомков. Исследование проводилось с 2015 года.

Цели данного исследования:

1. изучение биологических особенностей маисовых полозов, требований к их содержанию в неволе;

2. изучение окрасов, характерных для маисовых полозов, их вариации и типы насле-

дования, а также некоторых морфологических особенностей (наличие чешуи).

3. получение потомства с разнообразными окрасами, в том числе с яркой выраженной морфой amelanistic.

4. оценка расщепления фенотипов у потомства при дигибридном скрещивании.

Основными методами были: 1) гибридологический анализ, который включал отбор и подбор пары, оценку фенотипа и генотипа изучаемых особей и расщепление фенотипов при дигибридном скрещивании; 2) клинический анализ, включавший осмотр животных, оценку поведения (активность, половое поведение, аппетит, моменты «вылупления» змей из яиц и др.) и фотосъемка.

Результаты и обсуждение

Для исследования была выбрана пара маисовых полозов в возрасте 3 года. Самка морфы Stripe het Anerythristic, Amelanistic, Lavender, Нуро (рис. 1) и самец морфы Amelanistic Stripe het anerythristic (рис. 2).

Перед спариванием была проведена «зимовка» длительностью около двух месяцев. В это время змеи содержались в тесных боксах с плавным понижением температуры до +16° С. После было проведено ссаживание на 2 недели. Полозы спаривались неоднократно, поэтому точную дату спаривания отследить не удалось. Период развития яйцеклеток длился ориентировочно 35 дней. В это время самка потребляла больше корма, чем обычно. Перед кладкой яиц произошла линька (18.04.2018). Для самки было характерно достаточно беспокойное поведение. Перед кладкой было приготовлено гнездо. Кладка произошла 20.04.2018, и яйца сразу были помещены в инкубатор. Несмотря на первую кладку – у самки было 16 яиц, что считается достаточно большим количеством. Инкубировались яйца при температуре + (27–27,5)° С 64 дня. Выход кладки начался 24.06.2018 и продолжался в течение недели.

Целью спаривания данной пары было получение ярких змей морфы Amelanistic. Так как у самки был дикий тип окраса (Normal), то ее генотип должен иметь две доминантные аллели (**R-B-**). Генотип самки **RrBb** – дигетерозигота, т.к. в потомстве были получены особи с морфами SNOW, а самца **Rrbb**, т.к. он был Amelanistic.



Рис. 1. Фото. Самка морфы Stripe het Aneythristic, Amelanistic, Lavender, Нуно



Рис. 2. Фото. Самец морфы Amelanistic Stripe het Aneythristic



Рис.3. Фото. Самка морфы Amelanistic stripe cube



Рис. 4. Фото. Самка морфы Stripe



Рис. 5. Фото. Самец морфы Snow stripe



Рис. 6. Фото. Самка морфы Amelanistic stripe

В результате скрещивания должно появиться потомство следующих морф: Normal (**RrBb**), Anery (**rrBb**), Amel (**Rrbb**), Snow (**rrbb**). Также все потомство должно иметь измененный паттерн STRIPE. В итоге появилось 15 змей (один эмбрион погиб), из которых:

Две самки морфы STRIPE с генотипом **RrBb** (het amel poss het aneryamelella vender hypo).

Один самец морфы STRIPE CUBE с генотипом **RrBb** (het amel poss het anery amel lavender hypo).

Один самец и три самки морфы AMELANISTIC STRIPE с генотипом **Rrbb** (poss het anery lavender hypo) (рис. 6).

Два самца и самка морфы AMELANISTIC STRIPE CUBE **Rrbb** (poss het anery lavender hypo) (рис. 3).

Две самки морфы STRIPE **RrBb** (het amel poss het anery amel lavender hypo) (рис. 4).

Два самца морфы ANERYTHRISTIC STRIPE **rrBb** (het amel poss het lavender hypo).

Два самца и самка морфы SNOW STRIPE **rrbb** (poss het lavender hypo) (рис. 5).

Поскольку ген Motley Striped, рецессивный полиморфный, то предположить варианты аллелей в генотипе отдельной особи достаточно сложно. Однако по полученному потомству отчетливо прослеживается доминирование паттерна STRIPE CUBE – селекционно закрепленной вариации STRIPE, при которой от головы змеи идут характерные полосы, которые во второй половине тела переходят в квадраты, напоминающие седла, также был получен вариант морфы AMELANISTIC STRIPE CUBE, включающий эти два гена: основного окраса AMEL и паттерна STRIPE CUBE.

Заключение

В результате правильного подбора родительской пары маисовых полозов, с учетом их генотипа, получены различные и ожидаемые по окрасу змеи, с шестью вариантами морф – STRIPE CUBE, AMELANISTIC STRIPE, AMELANISTIC STRIPE CUBE, STRIPE, ANERYTHRISTIC STRIPE, SNOW STRIPE, в том числе с морфой AMELANISTIC. Таким образом, несмотря на большое разнообразие окрасов у данного вида полозов, наследование их подчиняется законам Менделя, и это можно прогнозировать, зная правила наследования и соблюдая требования отбора и подбора пар животных.

Итогом данной работы стало разведение маисовых полозов с желаемыми окрасами – морфами. Потомство, благодаря созданию оптимальных условий содержания и инкубации яиц, получилось здоровым и правильно сформировавшимся.

Список литературы

1. Систематический список позвоночных животных в зоологических коллекциях на 01.01.2012 / Т.Ф. Андреева, Т. А. Вершинина, М. Я. Горецкая и др. // Информационный сборник Евроазиатской региональной ассоциации зоопарков и аквариумов. Выпуск № 31. Том II. Межвед. сбор. науч. и науч.-метод. тр. / Под ред. В. В. Спицина. М.: Московский зоопарк. 2012. С. 289.
2. Чегодаев А. Е. Ужи и полозы. Содержание. Разведение. Профилактика заболеваний. / А. Е. Чегодаев. М.: Аквариум-Принт. 2009. 80 с.
3. Burbrink F. T. Systematics of the eastern ratsnake complex (ELAPHE OBSOLETA) / Burbrink F.T. // Herpetological Monographs. № 15. 2001. P. 53.
4. Scott A. Feeding Ecology of the Snake Community of the Red Hills Region Relative to Management for Northern Bobwhite: Assessing the Diet of Snakes Using Stable Isotopes. / Scott A., Rush S. A., Sash K., Carroll J. // Coepia: June 2014. Vol. 2014. № 2. P. 288–289.

Объективная проверка слуха у животных. ВАЕР тест

С 2018 года ЧОУ ДПО "Институт Ветеринарной Биологии" проводит обучающий курс по объективной проверке слуха у животных, проведению ВАЕР-теста у собак, кошек и других видов животных. Курс включает в себя теоретическую и практическую программы. В теоретической части занятий, слушатели знакомятся с теорией процесса регистрации вызванных слуховых потенциалов и основами нейрофизиологии. За время практических занятий каждый курсант обучается самостоятельно проводить осмотр животного перед проведением ВАЕР теста, проверять племенные документы (для выписки сертификата допуска в разведение) непосредственно выполнять ВАЕР тест, фиксировать данные тестирования, интерпретировать данные тестирования, выписывать экспертное заключение о результатах ВАЕР теста. По окончании курсов слушатели, прошедшие итоговое испытание, получают СЕРТИФИКАТ СПЕЦИАЛИСТА по проведению ВАЕР теста.

Курс рассчитан на практикующих ветеринарных врачей. На курсах организована продажа книг по ветеринарии. Вы можете забронировать интересующие вас издания через форму на сайте, а оплатить и получить заказ в первый день занятий. Место проведения: Санкт-Петербург, ул. Ораниенбаумская, д. 3, лит. Б, ЧОУ ДПО "Институт Ветеринарной Биологии" (схема проезда)

Предварительная регистрация обязательна! Для регистрации на данный курс необходимо прислать заявку в свободной форме на адрес E-mail: virclin@mail.ru

DOI: 10.24411/2074-5036-2019-10033

УДК 57.047

Ключевые слова: *Candida maltosa*, иммунный статус, титр антителKeywords: *Candida maltosa*, immune status, antibody titer

Рустамов Р. Д., Трофимов О. В., Пак И. В.

**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ДРОЖЖЕВОЙ ДОБАВКИ НА ПОКАЗАТЕЛИ
ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ**
*ASSESSING THE INFLUENCE OF YEAST ADDITIVE ON THE IMMUNOLOGICAL
STATUS PARAMETERS OF FARM ANIMALS*

ФГАОУ Тюменский государственный университет
Адрес: 625003, г. Тюмень, ул. Володарского, 6
Tyumen State University
Address: 625003, Tyumen, Volodarsky street, 6

Рустамов Ризван Дилман оглы, аспирант,
E-mail: rizvanich@mail.ru. Тел.: 8 (3452) 597400 (доб. 16622)
Rustamov Rizvan Dilman oglu, Post-graduate student
E-mail: skyriz@yandex.ru. Тел.: 8 (3452) 597400 (ext. 16622)

Трофимов Олег Владимирович, кандидат биологических наук, доцент кафедры экологии и генетики
E-mail: oleg_v_trofimov@mail.ru. Тел.: 8 (3452) 597400 (доб. 16612)
*Trofimov Oleg Vladimirovich, PhD in Biological Sciences, Associate professor of the Department of Ecology
and Genetics. E-mail: oleg_v_trofimov@mail.ru. Tel.: 8 (3452) 597400 (ext. 16612)*

Пак Ирина Владимировна, доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой экологии и генетики
E-mail: pakiv57@mail.ru. Тел.: Тел.: 8 (3452) 597400 (доб. 16604)
Pak Irina Vladimirovna, Doctor of Biological Sciences, Professor, Head Department of Ecology and Genetics
E-mail: pakiv57@mail.ru. Тел.: 8 (3452) 597400 (ext. 16604)

Аннотация. Цель работы заключалась в оценке влияния дрожжевых добавок *Candida maltosa* ВСБ-829 и *Candida maltosa* Тм-12 на показатели иммунного статуса сельскохозяйственных животных. Дрожжевую биомассу получали с использованием метода культивирования микроорганизмов в биоферментере «BioFlo 115» по отработанной нами технологии с последующим центрифугированием и высушиванием в лиофилизаторе FreeZone 2.5. Полученную биомассу добавляли в рацион питания опытных животных в количестве 1,5 % цыплятам-бройлерам (кросс Арбор Айкерс) и 2,0 % телятам. Оценку влияния дрожжевых добавок на показатели иммунитета проводили на основе определения общего содержания иммуноглобулинов в сыворотке крови по методу Бредфорда и с использованием электрофореза по Лэммли. Титры антител определяли методом иммуноферментного анализа. Было показано, что кормовые добавки на основе дрожжей *Candida maltosa* положительно влияют на иммунный статус цыплят-бройлеров и телят. Во всех опытных группах наблюдается увеличение содержания иммуноглобулинов в сыворотке крови. Выявлено при использовании дрожжевой добавки увеличение титра антител у вакцинированных цыплят против вирусов Ньюкаслской болезни и инфекционного бронхита кур.

Summary. The study is intended to assess the influence of the yeast additives *Candida maltosa* VSB-829 and *Candida maltosa* Tm-12 on the immune status parameters of farm animals. The yeast biomass was generated using a method of cultivation of microorganisms in the "BioFlo 115" biofermentor according to the technology developed by us, followed by centrifugation and drying out in the "FreeZone 2.5" lyophilizer. The obtained biomass was added to the diet of the test animals in the amount of 1.5 % of the total feed volume for broiler chickens (cross Arbor Ikers) and 2.0 % of the total feed volume for calves. The impact of the yeast supplements on the parameters of immunity was assessed with measuring the total content of immunoglobulins in the blood serum by the Bradford method and using Laemmli electrophoresis method. Antibody titers were measured with enzyme-immunoassay (ELISA method). The study revealed the positive effect of the *Candida maltosa* based yeast additives on the immune status of broiler chickens and calves. An increase in the content of immunoglobulins in the blood serum was observed in all experimental groups. An increase in antibody titer against viruses of Newcastle disease and avian infectious bronchitis was detected in vaccinated chickens when using the yeast additives.

Введение

В настоящее время активное развитие сельского хозяйства во многом связано с использованием современных наукоемких технологий. Одним из таких направлений является биотехнологическое производство. С помощью методов биотехнологии можно решить проблему сбалансированного питания и иммунологической резистентности животных. Основываясь на этом подходе, актуальными остаются исследования влияния микробных добавок на продуктивность и устойчивость животных [1].

Помимо источников биологически активных веществ (белков, аминокислот, витаминов и др.) микроорганизмы могут выступать в роли пробиотических препаратов [2, 6].

В настоящее время пробиотики нашли свое применение в качестве иммуностимулирующих препаратов. Объясняется это тем, что пробиотики обладают способностью стимулировать лимфатическую систему кишечника. Стимуляция последней приводит к активации мукозного иммунитета за счет усиления активности клеток неспецифического иммунитета и синтеза иммуноглобулинов [3, 4, 5]. Пробиотики обеспечивают также более полное усвоение кормов за счет синтеза экзогенных ферментов.

В последнее время в животноводстве большое внимание уделяется изучению роли пробиотиков на основе бактерий, тогда как роль дрожжей как возможных пробиотических препаратов остается недостаточно изученной, что делает исследования в этом направлении актуальными.

Цель исследований. Целью настоящей работы явилось изучение влияния дрожжевой добавки *Candida maltosa* на показатели иммунитета цыплят-бройлеров и телят.

Материалы и методы

Исследование проводили на базе лаборатории биотехнологии и генодиагностики Тюменского государственного университета в 2015–2017 гг.

В работе использовали дрожжевые добавки на основе двух штаммов дрожжей *Candida maltosa* ВСБ-829 (по ВКПМ Y-2043) и *Candida maltosa* Тм-12 (по ВКПМ

Y-612), которые были приобретены во ВКПМ ФГУП «ГосНИИгенетика». Биомассу дрожжей получали культивированием в жидких питательных средах с уровнем рН 6,5, содержащих 1 % пептона, 2 % D-глюкозы и 0,5 % дрожжевого экстракта. Условия культивирования микроорганизмов были определены в ходе экспериментальных работ по подбору оптимального состава питательной среды (путем испытания 8 вариантов сред) и выбора оптимального уровня рН среды. После предварительного автоклавирования и добавления антибиотика хлорамфеникола в питательную среду, проводили пересев колоний дрожжей из чашек Петри.

Препаративные количества дрожжевой добавки получали в биоферментере методом прерывистого культивирования. Нарботанную клеточную суспензию концентрировали методом последовательного центрифугирования при 2000 g в течение 5 мин. Осажденную биомассу высушивали в лиофилизаторе FreeZone 2.5 (фирмы «Labconco»). Испытания полученных кормовых добавок проводили на цыплятах-бройлерах (кросс Арбор Айкерс) и телятах.

Исследование на цыплятах-бройлерах проводилось в лаборатории Центра биотехнологии и генодиагностики. При этом были сформированы группы опытных цыплят-бройлеров и контрольная группа, в возрасте 14 суток. Кормление цыплят с включением дрожжевой добавки в количестве 1,5 % от общего объема стандартного суточного рациона проводили в течение 40 суток. В корм контрольной группы дрожжевая добавка не включалась.

На 20-ые сутки кормления проводили вакцинацию 50 % цыплят-бройлеров из каждой группы инактивированной комплексной вакциной «АВИВАК», которая содержала в себе антигены Ньюкаслской болезни (НБ), инфекционного бронхита кур (ИБК), реовирусной инфекции (РЕО) и инфекционной бурсальной болезни (ИББ). Невакцинированные цыплята служили дополнительным контролем. В конце опыта проводили взятие сыворотки крови у испытуемых цыплят.

Параллельно проводилось испытание кормовых добавок на телятах. Кормление телят дрожжевыми добавками проводилось в ЗАО «Агрофирма Луговская». При этом были сформированы 3 группы испытуемых животных: две опытные группы, получавшие дрожжевую добавку (в количестве 2 % от общего объема суточного рациона) *Candida maltosa* ВСБ-829 (группа ВСБ-829) и *Candida maltosa* Тм-12 (группа Тм-12), и одна контрольная группа, не получавшая в составе корма дрожжевую добавку. Каждая группа включала по 10 животных. Общий период кормления составил 50 суток. Взятие биологического материала (сыворотки крови) осуществлялось 4 раза: 1-ое взятие до начала кормления с дрожжевой добавкой (1 сутки), 2-ое взятие после 10 суток кормления с дрожжевой добавкой, 3-ье взятие – через 30 суток после кормления с дрожжевой добавкой и 4-ое взятие – через 50 суток после кормления с дрожжевой добавкой.

Иммуноферментный анализ сыворотки крови цыплят-бройлеров проводили по стандартной методике, включавшей в себя следующие этапы: инкубацию с использованием планшетного термощейкера «PST-60HL» (BioSan); промывку на планшетном вошере «WellWash4МК» (Thermo Fisher Scientific) и измерение оптической плотности на планшетном спектрофотометре «Multiskan FC» (Thermo Fisher Scientific). В анализе использовали набор фирмы ООО «НПП АВИБАК» для выявления антител к вирусам инфекционного бронхита кур (IBV), инфекционной бурсальной болезни птиц (IBDV), реовируса птиц (ARV), Ньюкаслской болезни (NDV). Постановку анализа проводили в соответствии с инструкцией набора «АВИБАК» для проведения ИФА. В качестве контроля использовали сыворотку крови кур с антителами к исследуемым антигенам (положительный) и сыворотку крови, не содержащую антитела (отрицательный).

Количественный анализ иммуноглобулинов в крови цыплят-бройлеров и телят проводили по методу Бредфорда. Для этого предварительно осаждали иммуноглобулины с использованием насыщенного раствора сульфата аммония. Концентрацию опре-

деляли на спектрофотометре «Eppendorf Biospectrometr» [7].

Электрофорез иммуноглобулинов проводили на основе метода ДСН-электрофореза по Лэммли [10]. Для визуализации иммуноглобулинов в геле их окрашивали серебром.

Полученные результаты были статистически обработаны с помощью прикладных программ «Microsoft Office Excel» и «Statistica».

Результаты исследований

Кормление сформированных групп цыплят осуществляли в течение 40 дней. В рацион питания опытных групп цыплят добавляли 1,5 % микробной добавки (Тм-12 и ВСБ-829 соответственно). После окончания кормления отбирали сыворотку крови для проведения иммунологических анализов.

Определение титров антител методом ИФА позволило выявить влияние дрожжевой добавки на иммунитет цыплят. У вакцинированных цыплят, получавших с кормом дрожжевую добавку, усиливается иммунный ответ против вируса Ньюкаслской болезни (NDV) и инфекционного бронхита кур (IBV). Против остальных вирусов титры антител в опытных группах вакцинированных цыплят, получавших кормовую добавку, были на уровне показателей в контрольных группах (табл. 1).

Полученные данные по количественному определению содержания иммуноглобулинов свидетельствуют об увеличении концентрации иммуноглобулинов в сыворотке крови подопытных животных в сравнении с контролем на 60 % (табл. 2).

О повышении иммуноглобулинов у цыплят, употреблявших с кормом *Candida maltosa* ВСБ-829 и Тм-12, свидетельствуют и результаты анализа электрофореграмм (рис. 1). Сопоставление с белковым маркером показало, что увеличивается доля иммуноглобулинов с молекулярной массой 70 kDa и более 20 kDa, в сравнении с контролем.

Полученные результаты по количественному анализу концентрации иммуноглобулинов у телят свидетельствуют о достоверном увеличении концентрации иммуноглобулинов у животных, получавших дрожжевую добавку в составе корма, в сравнении с кон-

Таблица 1

Титры специфических антител у цыплят-бройлеров

Группы	Титр антител (средний показатель)			
	Вирус			
	NDV	IBV	IBDV	ARV
Пороговые значения титров				
	>1528	>765	>1677	>1899
Невакцинированные цыплята				
ВСБ-829	1:291	1:177	–	1:145
Тм-12	1:150	1:223	1:7	1:124
Контроль	1:230	1:14	–	1:71
Вакцинированные цыплята				
ВСБ-829	1:2298 *	1:846 *	1:23	1:387
Тм-12	1:3470 *	1:1119 *	1:25	1:232
Контроль	1:954	1:469	1:22	1:131
Контроли ИФА				
Положительный	1:6620	1:9941	1:1179	1:13659
Отрицательный	–	–	–	–

Примечание: * – различия достоверны между контролем и опытными вариантами при $p < 0,01$.

Таблица 2

Концентрация иммуноглобулинов у разных групп цыплят

	Группы цыплят-бройлеров		
	Контроль	ВСБ-829	Тм-12
Средняя концентрация иммуноглобулинов (мг/мл)	544±25	881±62*	890±53*

Примечание: * – различия достоверны между контролем и опытными вариантами при $p < 0,01$.

Таблица 3

Концентрация иммуноглобулинов у разных групп телят

Группы телят	Средняя концентрация иммуноглобулинов (мг/мл)			
	1 сутки (до кормления)	10 суток кормления добавкой	30 суток кормления добавкой	50 суток кормления добавкой
Контроль	666±20	666±70	613±82	632±43
ВСБ-829	628±60	592±81	680±131 *	730±61 *
Тм-12	403±100	520±110 **	654±94 **	761±75 ***

Примечание:

* – различия достоверны в группе телят, употреблявших ВСБ-829 между 30 сутками кормления и 1 сутками, а также между 50 сутками и 1 сутками при $p < 0,05$;

** – различия достоверны в группе телят, употреблявших Тм-12 между 10 сутками кормления и 1 сутками, а также между 30 сутками и 1 сутками при $p < 0,05$;

*** – различия достоверны в группе телят, употреблявших Тм-12 между 50 сутками кормления и 1 сутками при $p < 0,01$.

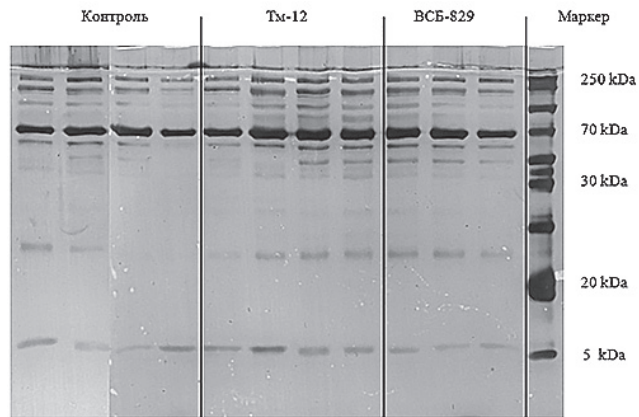


Рис. 1. Анализ фракций иммуноглобулинов в сыворотке крови цыплят-бройлеров.

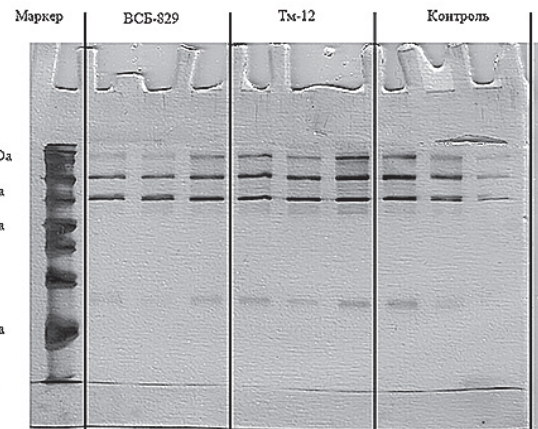


Рис. 2. Анализ фракций иммуноглобулинов в сыворотке крови телят.

тролем (табл. 3). Отмечено, что увеличение концентрации иммуноглобулинов с увеличением возраста наиболее отчетливо проявляется в группе телят, в рационе питания которых присутствовала кормовая добавка *Candida maltosa* Тм-12.

Анализ фракций иммуноглобулинов на электрофореграммах у телят не выявил существенных различий между группами (рис. 2). Возможно, все изменения происходят на уровне минорных фракций, которые обычным методом ДСН-электрофореза по Лэммли визуализировать не удалось.

Таким образом, использование дрожжевой добавки *Candida maltosa* в рационе питания цыплят-бройлеров и телят положительно отразилась на иммунологических показателях животных.

Обсуждение результатов

Полученные данные о положительном влиянии микробного белка на рост животных, согласуются с результатами, полученными другими исследователями [8, 9].

Положительное влияние дрожжевой добавки на иммунитет подопытных животных можно объяснить стимулирующим эффектом компонентов добавки. Используемые в работе кормовые добавки представляют собой гомогенный продукт штаммов дрожжей *Candida maltosa* ВСБ-829 и Тм-12, обогащенный продуктами жизнедеятельности последних (микроэлементами, белками, витаминами и др.). Немаловажное значение играют живые клетки, находящиеся в дрож-

жевой добавке. Микроорганизмы, достигшие кишечника вместе с кормами, начинают активно контактировать с рецепторами лимфоидных тканей, тем самым вызывая активацию иммунной системы. Также попадая в кишечник, дрожжи участвуют в процессах нейтрализации токсических веществ.

Заключение

Результаты работы по испытанию дрожжевых добавок *Candida maltosa* ВСБ-829 и *Candida maltosa* Тм-12 позволили выявить влияние этих добавок на показатели иммунитета испытываемых животных.

Использование дрожжевой добавки в кормлении цыплят-бройлеров повышает титр антител против возбудителей Ньюкаслской болезни (NDV) и инфекционного бронхита кур (IBV). Выявлено увеличение общего содержания иммуноглобулинов при использовании кормовых добавок *Candida maltosa* ВСБ-829 и *Candida maltosa* Тм-12.

Таким образом, проведенные испытания позволили получить данные о положительном влиянии кормовых добавок *Candida maltosa* ВСБ-829 и Тм-12 на иммунитет животных. Этот результат свидетельствует о перспективности продолжения исследований в этом направлении.

Список литературы

1. Егоров И. А. Современные подходы к кормлению птицы / И. А. Егоров // Птицеводство. 2014. № 4. С. 11–16.
2. Егорова Т. А. Влияние пробиотиков на основе *Saccharomyces sp.* и *Bacillus subtilis* на бактериальное

сообщество слепых отростков кишечника и продуктивность цыплят бройлеров / Т. А. Егорова, Т. Н. Ленкова, Л. А. Ильина, Е. А. Ёылдырым, И. Н. Никонов, В. А. Филиппова, Г. Ю. Лаптев, Н. И. Новикова, А. А. Грозина, В. А. Манукян, В. И. Фисинин, И. А. Егоров // *Сельскохозяйственная биология*. 2016. Т. 51. № 6. С. 891–902.

3. Крапивина Е. В. Иммуный статус телят под влиянием пробиотика Провагена / Е. В. Крапивина, Д. В. Иванов, А. И. Феськов, Ю. Н. Федоров, А. И. Албулов, О. В. Буханцев, О. А. Богомолова // *Сельскохозяйственная биология*. 2012. № 4. С. 78–82.

4. Мулюкова Э. Ф. Биохимические и иммунологические показатели крови цыплят-бройлеров на фоне вакцинации и при использовании пробиотика «Ветоспорин-С» в сочетании с кормовой добавкой «Витамэлам» / Э. Ф. Мулюкова, А. В. Андреева // *Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана*. 2015. С. 155–158.

5. Смирнова Л. В. Применение дрожжевого пробиотика в рационах молочных коров / Л. В. Смирнова,

С. В. Субботин, Е. Е. Хоштария // *Молочнохозяйственный вестник*. 2014. № 2 (14). С. 36–40.

6. Фисинин В. И. Биопрепарат на основе штамма *Lactobacillus plantarum* 1-211 для животноводства. Сообщение. Кормление бройлеров / В. И. Фисинин, Е. Н. Андрианова, И. И. Чеботарев, Г. Ю. Лаптев, И. Н. Никонов, Л. А. Ильина, А. В. Савинов, Н. Г. Машенцева, Д. Л. Клубукова, Е. А. Ёылдырым, Н. И. Новикова // *Сельскохозяйственная биология*. 2017. Т. 52. № 2. С. 382–390.

7. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.

8. Clements M. Stress, disease and nutritional solutions in poultry production / M. Clements // *Poultry International*. 2011. Vol. 50. № 1. P. 22–25.

9. Herich R. Lactic acid bacteria, probiotics and immune system / R. Herich, M. Levcut // *Vet. Med.* 2002. № 47 (6). P. 169–180.

10. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.

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 мультичастотные высокой плотности. Рабочие частоты от 2,5 до 10 МГц. Конвексные, линейные, полостные

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>

DOI: 10.24411/2074-5036-2019-10034

УДК: 597.554.3-12:597-111.11

Ключевые слова: карп, породы, краснуха, кровь, почка, селезенка, лейкоциты, нагульный период

Keywords: carp, breeds, rubella, blood, kidney, spleen, leukocytes, feeding period

¹Суворова Т. А., ²Пронина Г. И., ¹Микряков Д. В., ²Петрушин А. Б.

**СОСТАВ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ
И ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ОРГАНОВ КРАСНУХОУСТОЙЧИВОЙ
ПОРОДЫ КАРПА В КОНЦЕ НАГУЛЬНОГО ПЕРИОДА**
*COMPOSITION OF LEUKOCYTES OF PERIPHERAL BLOOD AND IMMUNOCOMPETENT
ORGANS OF RED SUSTAINABLE BREED OF CARP IN THE FEEDING PERIOD*

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии внутренних вод
им. И.Д. Папанина Российской академии наук

Адрес: 152742, Россия, Ярославская обл., Некоузский район, п. Борок
I.D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences
Address: 152742, Russia, Yaroslavl Region, Nekouzsky District, pos. Borok

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Всероссийский научно-исследовательский
институт ирригационного рыбоводства

Адрес: 142460, Россия, Московская область, Ногинский р-он, пос. Воровского, ул. Сергеева, д. 24
Federal State Budget Scientific Institution All-Russian Research Institute of Irrigation Fish Culture
Address: 142460, Russia, Moscow Region, Noginsk District, pos. Vorovskogo, st. Sergeeva, 24

Суворова Татьяна Александровна, научный сотрудник лаборатории иммунологии.

E-mail: tanya@ibiw.yaroslavl.ru. Тел. 8(485)47-24-681.

Suvorova Tatyana Aleksandrovna, Researcher of Immunology Laboratory.

E-mail: tanya@ibiw.yaroslavl.ru. Tel. 8 (485) 47-24-681.

Пронина Галина Иозеповна, доктор биологических наук; главный научный сотрудник;

заведующий лабораторией. E-mail: gidrobiont4@yandex.ru.

Pronina Galina Iozepovna, Doctor of Biological Sciences; Chief Researcher; Head of the Laboratory.

E-mail: gidrobiont4@yandex.ru.

Микряков Даниил Вениаминович; кандидат биологических наук; заведующий лабораторией иммунологии.

E-mail: daniil@ibiw.yaroslavl.ru. Тел. (485)47-24-681.

Mikryakov Daniil Veniaminovich; PhD of Biological Sciences; Head of the Immunology Laboratory.

E-mail: daniil@ibiw.yaroslavl.ru; Tel. (485) 47-24-681.

Петрушин Александр Борисович; кандидат сельскохозяйственных наук; ведущий научный сотрудник;

заместитель заведующего лабораторией. E-mail: shurapetrushin@yandex.ru.

Petrushin Alexander Borisovich; PhD of Agricultural Sciences; Leading Researcher; Deputy Head of the Laboratory.

E-mail: shurapetrushin@yandex.ru.

Аннотация. В статье представлены результаты изучения состава лейкоцитов периферической крови и иммунокомпетентных органов ангелинской краснухостойчивой породы карпа в конце нагульного периода. Установлено, что периферическая кровь и органы кроветворения краснухостойчивой породы отличались долей содержания лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов, бластных форм клеток и интенсивностью лейкопоэза от карпов других изученных селекционных групп. Больше число достоверных отличий установлено между краснухостойчивыми и чешуйчатыми карпами. Отмечены сезонные изменения лейкоцитарной формулы у исследованных рыб. Количество лимфоцитов в лейкограммах периферической крови у всех групп исследованных карпов снизилось, а в кроветворных органах возросло по сравнению с весенними показателями. Наибольшие изменения в лейкограммах и интенсивности лейкопоэза разных сезонов отмечены у краснухостойчивых карпов. Полученные данные представляются весьма важными для понимания направления морфофизиологических перестроек клеточного состава лейкоцитов при селекции рыб, обладающих невосприимчивостью к инфекционным заболеваниям.

Summary. The article presents the results of a study of the composition of peripheral blood leukocytes and immunocompetent organs of angelic rubel resistant breed of carp at the end of the feeding period. It was found that peripheral blood and hematopoietic organs of the rubella-resistant breed differed in terms of the content of lymphocytes, monocytes, neutrophils, blast cell forms and the intensity of leukopoiesis from the carps of other studied breeding groups. A greater number of significant differences are found between rubel-resistant and scaly carp. Seasonal changes in leukocyte formula in the

studied fish were noted. The number of lymphocytes in the peripheral blood leukograms of all groups of carps studied decreased, and increased in the blood-forming organs as compared with the spring indicators. The greatest changes in leukograms and the intensity of leukopoiesis of different seasons were observed in red-resistant carps. The data obtained are very important for understanding the direction of the morphophysiological rearrangements of the cellular composition of leukocytes in the selection of fish that are immune to infectious diseases.

Введение

Одной из основных проблем рыбоводства, наносящей большой ущерб карповодству за счет гибели рыб и больших затрат на оздоровление хозяйства до сих пор остается краснуха – полиэтиологическое заболевание, вызываемое различными возбудителями [1, 9]. Лечение краснухи малоэффективно, поэтому одно из решений проблемы – селекция на иммунную устойчивость к возбудителям заболевания. В России выведена ангелинская краснухоустойчивая порода карпа [5]. Исследование этой породы позволит понять механизмы, обеспечивающие невосприимчивость рыб к инфекционным заболеваниям и получить данные, которые могут быть использованы в селекционных программах по созданию резистентных пород в аквакультуре.

Система крови выполняет как специфическую, так и неспецифическую защиту организма. Особый интерес представляет изучение клеток белой крови, т. к. количество, структура и соотношение лейкоцитов теснейшим образом связаны с функциональным состоянием рыб [2, 3, 4, 7]. Ранее авторами были установлены достоверные отличия в лейкоцитарных формулах периферической крови и органов кроветворения краснухоустойчивых и восприимчивых карпов в преднерестовый период [11], однако для получения более детальной информации необходимо изучение лейкоцитарной формулы в различные периоды рыбоводного сезона.

Цель работы: изучение состава лейкоцитов периферической крови и иммунокомпетентных органов краснухоустойчивых карпов в конце нагульного периода.

Материалы и методы

Исследования проводили в конце сентября – начале октября 2018 г. на трёхлетках карпов. Материал отбирали у 6 особей ангелинской чешуйчатой краснухоустойчивой породы, содержащихся на экспериментальной

прудовой базе «Сунога» ИБВВ им. И. Д. Папанина РАН Ярославской обл. Для сравнения использовали карпов из рыбоводного хозяйства «Кирия» Чувашской республики. Пробы отбирали от 8 экземпляров чешуйчатых и 8 зеркальных карпов, восприимчивых к возбудителям краснухи. У исследуемых рыб проводили отбор периферической крови и тканей органов (селезёнка и головная почка). Кровь отбирали из хвостовой вены. Каплю крови наносили на обезжиренное предметное стекло, делали мазок. Мазки-отпечатки головной почки и селезёнки делали со среза исследуемого органа. После этого препараты высушивали и фиксировали в 96% этаноле 30 мин. Подсохшие мазки и мазки-отпечатки окрашивали по Романовскому-Гимза. Препараты просматривали под световым микроскопом «Биомед-6ПР1-ФК» ($\times 360$), анализируя на каждом мазке 200 клеток белой крови. Лейкоциты идентифицировали согласно классификации Н. Т. Ивановой (1983).

Для определения индекса обилия лейкоцитов, или частоты встречаемости клеток белой крови, в мазке просматривали 100 полей зрения на различных участках препарата при увеличении 400х. В каждом поле зрения подсчитывали количество встреченных лейкоцитов, полученные данные суммировали и делили на 100, получая среднее число в одном поле зрения [8].

Статистическую обработку результатов исследования проводили по стандартным алгоритмам, реализованным в пакете программ Statistica v6.0, с использованием t-теста. Различия считали значимыми при $p \leq 0.05$.

Результаты исследований

В лейкоцитарных формулах периферической крови и иммунокомпетентных органов карпов выявлены характерные для данного вида клетки [4]: лимфоциты, моноциты (в органах их зрелая форма – макрофаги [12]), нейтро-, базо-, эозинофилы и бластные формы (табл. 1).

Таблица 1

Состав лейкоцитов в периферической крови и иммунокомпетентных органах карпов, %

	Лимфоциты	Моноциты/ макрофаги	Нейтрофилы		Базофилы	Эозино- филы	Бластные формы
			ПЯ	СЯ			
Периферическая кровь							
краснухостойчивая порода	72,83±3,33	9,33±0,65	4,83±0,7	1,52±0,31	0,66±0,42	4,58±1,47	6,25±2,02
чешуйчатые карпы	90,88±2,34 ¹	2,38±0,52 ¹	1,44±0,61 ¹	0,94±0,45	0,25±0,09	2,43±1,30	1,68±0,45 ¹
зеркальные карпы	81,25±2,38 ²	6,68±1,11 ²	4,75±0,75 ²	2,82±0,53 ²	0,07±0,06	0,56±0,31 ¹	3,87±0,76 ²
Головная почка							
краснухостойчивая порода	83,50±1,64	3,01±0,82	1,25±0,28	0,33±0,16	0,66±0,27	2,00±0,69	9,25±0,49
чешуйчатые карпы	84,83±2,83	4,62±1,31	2,56±0,42 ¹	1,25±0,31 ¹	0,19±0,13	0,68±0,26	5,87±1,23 ¹
зеркальные карпы	82,25±1,95	4,55±0,71	4,11±0,81 ¹	0,81±0,23	0,06±0,06 ¹	0,31±0,18 ¹	7,91±0,99
Селезёнка							
краснухостойчивая порода	92,00±1,04	1,51±0,50	0,50±0,12	0,25±0,11	0,42±0,20	0,91±0,20	4,41±0,74
чешуйчатые карпы	87,01±3,08	2,93±0,79	1,12±0,41	1,01±0,61	0,06±0,06	0,87±0,36	7,00±1,54
зеркальные карпы	87,62±1,67	4,25±1,31	1,94±0,47 ¹	0,68±0,18	–	0,32±0,09 ¹	5,19±0,64

Примечание: ¹ – достоверные отличия от краснухостойчивых; ² – достоверные отличия от чешуйчатых карпов.

Самый большой пул клеток белой крови карпа составляют лимфоциты – центральные клетки иммунной системы рыб. Лейкоциты других типов, принимающие участие в иммунологических реакциях организма и участвующие в фагоцитозе микроорганизмов, синтезе медиаторов иммунного ответа, неспецифических факторов иммунитета, представлены гораздо меньшим числом клеток. У исследованных особей процентное содержание лимфоцитов составляло 72,83–92 %, моноцитов/макрофагов – 1,51–9,33 %, нейтрофилов – 0,75–7,57 %, эозинофилов – 0,31–4,58 %, базофилов 0,06–0,66 % и бластных форм клеток – 1,68–9,25 % (табл. 1).

Карпы краснухостойчивой породы достоверно отличались от восприимчивых рыб более низким содержанием лимфоцитов периферической крови, нейтрофилов пронефроса, селезёнки и более высоким моноцитов

крови, бластных клеток крови и пронефроса и эозинофилов во всех тканях и органах. Стоит отметить, что чешуйчатые и зеркальные карпы между собой также различались процентным содержанием лейкоцитов периферической крови.

Исследования индекса обилия лейкоцитов не показали достоверных различий среди селекционных групп. Более высокий показатель, в отличие от весеннего периода, зафиксирован у восприимчивых пород карпов (табл. 2).

Обсуждение результатов

Анализ содержания отдельных пулов лейкоцитов показал, что их уровень зависит от вида исследуемой ткани и варьирует у разных селекционных групп. Кроме того, полученные данные отличались от таковых, полученных при аналогичных условиях в преднерестовый период [11].

Таблица 2

Индекс обилия лейкоцитов, (ед./п. зр.)

Краснухостойчивая порода	13,83±1,28
Чешуйчатый карп	18,57±2,48
Зеркальный карп	17,40±2,43

Головной отдел почек у костистых рыб – основной орган лимфо- и гранулопоза, функционально сходный с костным мозгом млекопитающих. Функционально-активных иммунокомпетентных клеток в почках концентрируется значительно больше, чем в других органах [6]. Основу иммунокомпетентных клеток селезенки составляют эндотелиоциты кровеносных сосудов, иммуноциты на разных этапах дифференцировки, гранулоциты и клетки мелано-макрофагального ряда [4]. Согласно современным представлениям основной функцией данного органа является эритро- и тромбопоз, затем – лимфопоз [4, 7]. Периферическая кровь, непрерывно циркулируя по системе замкнутых сосудов, постоянно омывает ткани, органы и системы органов, служит транзитом иммунокомпетентных клеток, в котором проявляется суммарный эффект изменения активности иммунной системы [4].

Лимфоциты у рыб, как и у всех позвоночных животных, относятся к группе наиболее быстро реагирующих клеток иммунной системы. Они осуществляют функции распознавания чужеродных тел, разрушения антигена, синтеза антител, образования предшественников антителообразующих клеток, клеток памяти, формирования специфического иммунитета и адаптации рыб к паразитам и токсическим факторам [7]. Доля лимфоцитов периферической крови у всех групп исследованных карпов снизилась на 1–22,7 %, а в кроветворных органах возросла по сравнению с весенними показателями. Наибольшее снижение числа клеток этого типа отмечено в лейкограммах крови ангелинских карпов, за счёт увеличения процентного содержания всех остальных популяций лейкоцитов.

Моноциты – активные фагоциты крови, поглощают продукты распада клеток и тканей, принимают участие в регуляции иммуно- и гранулопоза, влияют на миграционные свойства нейтрофилов. Существует также мнение о способности моноцитов инактивировать токсины [3]. Увеличение их количества в крови свидетельствует об усилении неспецифической защиты организма. Наибольшее число клеток этого типа зафиксировано нами в лейкограмме перифериче-

ской крови краснухостойчивых особей, что в 3,9 раза выше показателей преднерестового периода. Увеличение числа моноцитов у карпов к концу рыбоводного сезона отмечено и другими авторами [2].

В конце нагульного периода в периферической крови рыб возросло количество гранулоцитов по сравнению с данными, полученными весной. Более высоким содержанием нейтро-, эозино- и базофилов отличалась группа краснухостойчивых карпов. Основную массу гранулоцитарных клеток составляли палочкоядерные нейтрофилы. Нейтрофилы поглощают зараженные клетки при первом контакте с ними или разрушают их путем выделения токсических кислородных метаболитов. Базо- и эозинофильные гранулоциты у млекопитающих принимают активное участие в аллергических реакциях анафилактического типа. Базофилы рыб рассматривают и как регуляторы тканевого гомеостаза. Появление осенью в лейкограммах карпов разных пород базофилов отмечено и в работах других авторов [4, 10].

В лейкоцитарной формуле мазков крови и мазков-отпечатков гемопоэтических органов учитываются юные незрелые, или бластные, формы клеток, которые, подобно таковым у высших позвоночных, в дальнейшем замещают зрелые клетки в тканях и органах иммунной системы. Их доля в лейкограмме пресноводных видов составляет до 10 % [2, 4]. Осенью содержание бластных форм в периферической крови представителей ангелинской породы было выше, чем у восприимчивых особей и по сравнению с показателями преднерестового периода.

Используемый в наших исследованиях показатель индекса обилия лейкоцитов дает представление о функциональном состоянии гемо- и иммунопоэтической ткани и позволяет судить об интенсивности лейкопоза [8]. У краснухостойчивых особей зафиксировано менее интенсивное образование иммунокомпетентных клеток по сравнению с другими группами рыб и данными весеннего периода.

Характер выявленных отличий у краснухостойчивых карпов, возможно, связан с генетическими особенностями породы и относится к адаптивным реакциям иммунной системы.

Заключение

Таким образом, результаты исследования состава лейкоцитов в периферической крови и органах кроветворения краснухоустойчивой породы карпа показали отличия в доле содержания лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов, бластных форм клеток и интенсивности лейкопоэза от других изученных селекционных групп. Отличия зависели от структурно-функциональных характеристик тканей и органов и породных особенностей исследованных рыб. Полученные данные могут быть использованы в качестве маркеров при проведении селекционно-племенной работы по повышению устойчивости рыб к инфекционным заболеваниям.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-016-0019618 и частично в рамках государственного задания ФАНО России (тема № АААА-А18-118012690123-4).

Список литературы

1. Ихтиопатология: Учебники и учеб. пособия для студентов высших учебных заведений / Н. А. Головина [и др.]; Под ред. Н. А. Головиной, О. Н. Бауера. М.: Мир, 2003. 448 с.: ил.
2. Головина Н. А. Гематология прудовых рыб / Н. А. Головина, И. Д. Тромбицкий. Кишинев: Штиинца, 1989. 155 с.
3. Житенева Л. Д. Атлас нормальных и патологически измененных клеток крови рыб: справочник /

Л. Д. Житенева, Т. Г. Полтавцева, О. А. Рудницкая. Ростов-на-Дону: Ростовское книжное издательство, 1989. 112 с.

4. Иванова Н. Т. Атлас клеток крови рыб / Н. Т. Иванова. М: Легкая и пищевая пром-сть, 1983. 79 с.

5. Илясов Ю. И. Селекция рыб на повышение устойчивости к заболеваниям / Ю. И. Илясов // Актуальные вопросы пресноводной аквакультуры. Вып. 78. М.: Изд-во ВНИРО, 2002. С. 125–134.

6. Микряков В. Р. Клеточные основы иммунитета у рыб / В. Р. Микряков, Л. В. Балабанова // Физиология и паразитология пресноводных животных. Л.: Наука, 1979. С. 57–64.

7. Микряков В. Р. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды / В. Р. Микряков, Л. В. Балабанова, Е. А. Заботкина, Т. Б. Лапирова, А. В. Попов, Н. И. Силкина. М.: Наука, 2001. 126 с.

8. Микряков В. Р. Влияние солей некоторых тяжелых металлов на состав белой крови молоди ленского осетра *Acipenser baeri* / В. Р. Микряков, Т. Б. Лапирова // Вопросы ихтиологии. 1997. Т. 37. № 4. С. 538–542.

9. Пищенко Е. В. Аэромоназ (краснуха) карпов / Е. В. Пищенко // Рыбоводство и рыбное хозяйство. 2006. № 10. С. 32–34.

10. Пронина Г. И. Физиолого-иммунологические адаптации карпа к краснухе / Г. И. Пронина, Н. Ю. Корягина, А. А. Иванов // Известия ТСХА. 2015. Вып. 5. С. 94–105.

11. Суворова Т. А. Состав лейкоцитов периферической крови и иммунокомпетентных органов краснухоустойчивой породы карпа в преднерестовый период / Т. А. Суворова, Г. И. Пронина, Д. В. Микряков, А. Б. Петрушин // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. № 2 (42), 2019. С. 38–41.

12. Флёрва Е. А. Клеточная организация почек костистых рыб (на примере отрядов *Cypriniformes* и *Perciformes*) / Е. А. Флёрва. Ярославль: Ярославская ГСХА, 2012. 140 с.

реклама



ВЕТЕРИНАР.ru

Всё о ветеринарии для врачей и владельцев животных

- форум
- последние новости
- подборка статей
- справочники
- каталог лекарственных средств
- адреса ветклиник и зоомагазинов
- информация о выставках и конференциях
- анонсы ветеринарных журналов

Заходите на www.veterinar.ru, и Вы найдёте много интересной и полезной информации!

Приглашаем к сотрудничеству ветеринарных врачей и организации.

e-mail: invet@inbox.ru boldyрева@mail.ru

тел.: 8 (909) 646-76-43, 8 (916) 181-95-58

DOI: 10.24411/2074-5036-2019-10035

УДК: 619:616.995.

Ключевые слова: собаки, диروفилариоз, лейкоформула, белковый обмен, ферменты крови, липидный обмен
Keywords: dogs, dirofilariasis, leukoformula, protein metabolism, blood enzymes, lipidic metabolism

¹Беспалова Н. С., ²Золотых Т. А.

ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС СОБАК, БОЛЬНЫХ ДИРОФИЛАРИОЗОМ *GEMATOLOGICAL STATUS OF DOGS WITH DIROFILARIASIS*

¹ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I»

Адрес: 394087, Россия, г. Воронеж, ул. Мичурина, д. 1
Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter I
Address: 394087, Russian Federation, Voronezh, Michurina st., 1

²Ветеринарная клиника ВетЛига

Адрес: 394042, Россия, Воронеж, Минская ул., д. 9а
Veterinary clinic "VetLiga"
Address: 394042, Russian Federation, Voronezh, Minskaya st., 9a

Беспалова Надежда Сергеевна – доктор ветеринарных наук, профессор, профессор кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы, эпизоотологии и паразитологии.

E-mail: Nadezh.bespalova2014@yandex.ru. Тел.: 8(920)423-06-92

Bespalova Nadezhda Sergeevna. Doctor of Veterinary Science, Professor, Professor of the Department of Veterinary-Sanitary Expertise, Epizootology and Parasitology.

E-mail: Nadezh.bespalova2014@yandex.ru. Тел.: 8(920)423-06-92

Золотых Татьяна Алексеевна – кандидат ветеринарных наук, ветеринарный врач ветеринарной клиники «ВетЛига».

E-mail: zlata69@mail.ru. Тел.: 8(920) 219-22-17

Zolotykh Tatyana Alekseevna. PhD of Veterinary Sciences, Veterinary Clinic "VetLiga".

E-mail: zlata69@mail.ru. Тел.: 8(920) 219-22-17

Аннотация. Объектом исследования служили собаки, заразившиеся диروفилариозом в естественных условиях. Для определения гематологического статуса крови больных диروفилариозом собак изучили в динамике клинические и биохимические показатели. Установлено, что при интенсивности инвазии (ИИ) $249,6 \pm 9,5 - 254,8 \pm 10,6$ экз. личинок в мл крови развиваются эритропения, гипергемоглобинемия, лейкоцитоз, эозинофилия, увеличивается СОЭ. Количество эритроцитов было снижено, а лейкоцитов повышено в 15 % случаев. В 40 % случаев установлена лимфопения, в 45 % – эозинофилия. У 45 % собак была умеренно повышена СОЭ при высокой гиперхромии эритроцитов. У 85 % животных концентрация гемоглобина была выше, чем у здоровых в среднем на 16 %. В биохимическом статусе крови установлено в 65 % случаев повышение активности АСТ и в 70 % случаев – АЛТ. Более чем у половины больных животных установлено повышение активности амилазы, щелочной фосфатазы и креатинина. Показатель общего билирубина был высоким у 25 % больных животных за счет фракции свободного билирубина. При исследовании минерального обмена установлено у 35 % больных собак повышение количества калия и кальция, у 40 % – неорганического фосфора, при снижении концентрации натрия в 40 % случаев. При исследовании липидного обмена установлено снижение общих липидов у 40 % и общего холестерина – у 30 % больных животных. Полученные результаты исследований позволяют использовать показатели гематологического статуса, как биомаркеры глубины патологических процессов в организме собак при диروفилариозе и определяют сроки начала проведения патогенетической терапии.

Summary. The object of the research were the dogs who caught dirofilariasis under natural conditions. For determination of the hematologic status of blood of the dogs sick with a dirofilariasis clinical and biochemical indicators in dynamics were studied. It is found that at the intensity of invasion of $249.6 \pm 9.5 - 254.8 \pm 10.6$ units of larvae in ml of blood erythrocytopenia, hyperhemoglobinemia, leukocytosis, and eosinophilia develop, blood sedimentation rate increases. The quantity of erythrocytes was reduced, and leukocytes increased in 15 % of cases. In 40 % of cases the lymphopenia, in 45 % – an eosinophilia were determined. At 45 % of dogs blood sedimentation rate at a high hyperchromia of erythrocytes was moderately risen. 85 % of animals showed higher concentration of hemoglobin than that of healthy ones, on average by 16%. In the biochemical status of blood an increase in activity of aspartateaminotransferase was detected in 70 % of cases – alanineaminotransferase increased in 65 % of cases as well. More than a half of sick animals showed an increase in amylase, alkaline phosphatase and creatinine. 25 % of sick animals had a high indicator of the general bilirubin at the expense of fraction of free bilirubin. The research of mineral exchange revealed an increase in amount of potassium and calcium in 35 % of sick dogs, 40 % had an increase in inorganic phosphorus alongside with a decrease in concentration

of sodium in 40 % of cases. Research of lipidic metabolism found a decrease in the general lipids in 40 % of subjects and the general cholesterol decrease in 30 %. The received results of the research allow to use indicators of the hematologic status as biomarkers of depth of pathological processes in an organism of dogs at a dirofilyariasis and determine terms of starting pathogenetic therapy.

Введение

Дирофиляриоз – тяжелое инвазионное заболевание собак, сопровождающееся функциональными расстройствами разных систем организма. Попадая в кровь, токсины и продукты обмена веществ дирофилярий вызывают патологические изменения в организме больных собак, отражением состояния которого является гематологический статус. Глубина функциональных нарушений зависит от вида возбудителя, места его локализации в организме, длительности периода болезни и интенсивности инвазии. Все ученые, занимающиеся проблемой дирофиляриоза, указывают на изменения в общеклинических и биохимических показателях крови у больных собак [4, 7]. Изучение данного вопроса необходимо для определения глубины патологических изменений в организме больных дирофиляриозом собак и определения начала проведения патогенетической терапии.

Целью нашей работы было оценить роль и значимость гематологического статуса больных дирофиляриозом собак, вызванного *D. repens* и *D. immitis*, в характеристике тяжести течения инвазии и определении необходимости патогенетической терапии.

Материалы и методы

Для изучения гематологического статуса было исследовано 126 проб крови от служебных собак пород немецкая овчарка и лабрадор в возрасте 4–5 лет, зараженных *D. repens* и *D. immitis* в естественных условиях, и 47 проб от здоровых животных. Вид *D. immitis* был обнаружен в 35,4 %, *D. repens* – в 58,5 %, микстинвазия – в 6,1 % случаев. Интенсивность инвазии (ИИ) составляла $249,6 \pm 4,7$ – $254,8 \pm 5,3$ экз. личинок в мл крови. Для определения общеклинических показателей крови проводили дифференциальный подсчет лейкоцитов с выведением лейкоформулы в окрашенном методом Романовского-Гимзе мазке крови. Подсчет общего количества эритроцитов и лейкоцитов проводили в камере Горяева, скорость оседания

эритроцитов (СОЭ) определяли микрометодом Панченкова, количество гемоглобина – в биохимическом анализаторе.

Для определения биохимических показателей сыворотки крови собак использовали полуавтоматический анализатор «STAT FAX 3300» (США) и набор реактивов «Витал Диагностикс» (Россия). Определяли общий белок, активность трансфераз: аспартат- (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), амилазы, общий, свободный и связанный билирубин, глюкозу, мочевины, креатинин, общие липиды и общий холестерин. Обмен минеральных веществ оценивали по содержанию в сыворотке крови макроэлементов: калия, натрия, общего кальция и неорганического фосфора. Полученный цифровой материал статистически обрабатывали с помощью прикладных компьютерных программ с определением критерия достоверности.

Результаты исследований

Анализ состояния гематологического статуса показал, что у больных дирофиляриозом собак в стадии компенсации, независимо от вида возбудителя, наблюдается изменение в клинических показателях крови в сторону повышения гемоглобина в 11,4 % случаев, нейтрофилов за счет увеличения количества палочкоядерных форм в 16,7 % случаев по сравнению со здоровыми животными (таблица 1).

Количество эритроцитов было снижено, а лейкоцитов повышено в 15 % случаев. В 40 % случаев установлена лимфопения, в 45 % – эозинофилия. У 45 % собак была умеренно повышена СОЭ при высокой гиперхромии эритроцитов. У 85 % животных концентрация гемоглобина была выше, чем у здоровых в среднем на 16 %.

В биохимическом статусе установлено в 65 % случаев повышение активности АСТ и в 70 % случаев – АЛТ. Более чем у половины больных животных установлено повышение амилазы, щелочной фос-

Таблица 1

Клинические показатели крови здоровых и больных дирофиляриозом собак

№ п/п	Показатели крови	Здоровые собаки	Собаки, больные дирофиляриозом
1	Гемоглобин, г/л	151,4±13,1	175,5±19,1
2	Эритроциты, 10 ¹² /л	6,5±0,8	5,7±0,5
3	Лейкоциты, 10 ⁹ /л	9,6±1,7	11,9±3,9
4	Нейтрофилы палочкоядерные, %	3,2±0,3	4,5±0,2
5	Нейтрофилы сегментоядерные, %	64,8±5,0	65,4±8,5
6	Лимфоциты, %	23,6±3,4	20,7±2,9
7	Эозинофилы, %	4,8±0,2	5,7±0,9
8	Моноциты, %	4,5±0,8	4,3±0,8
9	СОЭ, мм/ч	2,4±0,01	5,7±0,2

фатазы и креатинина. Показатель общего билирубина был высоким у 25 % больных животных за счет фракции свободного билирубина.

При исследовании минерального обмена установлено у 35 % больных собак повышение количества калия и кальция, у 40 % – неорганического фосфора, при снижении концентрации натрия в 40 % случаев.

При исследовании липидного обмена установлено снижение общих липидов у 40 % и холестерина – у 30 % больных животных (таблица 2).

Обсуждение результатов

Ряд авторов описывает отклонения в лейкоцитарной формуле собак, больных дирофиляриозом, независимо от вида гельминта, которые характеризуются развитием анемии с уменьшением количества эритроцитов и гемоглобина, повышением СОЭ в 67,52±4,35 % случаев при нормальном количестве лейкоцитов у 81,06±3,66 % инвазированных собак. В лейкоформуле было повышено содержание сегментоядерных клеток у 70,83±9,48 % и снижение лимфоцитов у 67,83±4,38 % животных. Процентное

Таблица 2

Биохимические показатели крови здоровых и больных дирофиляриозом собак

№ п/п	Показатель	Здоровые собаки	Больные собаки
1	АЛТ, ЕД/л	36,3±9,7	56,9±4,5
2	АСТ, ЕД/л	30,5±8,1	35,2±9,9
3	ЩФ, ЕД/л	34,63±9,1	38,6±3,1
4	Амилаза, ЕД/л	790,2±30,2	938,4±19,2
5	Глюкоза, ммоль/л	4,2±0,7	4,6±0,7
6	Креатинин, мкмоль/л	85,1±6,0	112,5±19,1
7	Мочевина, ммоль/л	5,8 ±0,2	6,7±0,4
8	Билирубин общий, мкмоль/л	6,3±1,5	8,0±0,7
9	Билирубин свободный, мкмоль/л	4,7±0,4	4,9±0,6
10	Билирубин связанный, мкмоль/л	1,6±0,1	3,1±0,5
11	Общий белок, г/л	62,6±7,3	68,9±7,1
12	Общий холестерин, ммоль/л	8,6±0,1	4,2±0,02
13	Общие липиды, г/л	11,16±0,4	7,68±0,2
14	Неорганический натрий, ммоль/л	144,3±13,1	135,4±11,1
15	Калий, ммоль/л	5,5±0,04	7,2±0,01
16	Общий кальций, ммоль/л	2,73±0,03	3,75±0,03
17	Неорганический фосфор, ммоль/л	1,42±0,01	0,56±0,04

соотношение эозинофилов, палочкоядерных нейтрофилов и моноцитов было в пределах нормы. В частности, в общеклинических показателях наблюдается гипохромная регенеративная анемия, лейкоцитоз, лимфоцитоз, нейтрофилия, эозинофилия, базофилия, увеличение СОЭ [3, 5, 6].

В результате проведенных нами исследований, в клиническом статусе крови больных дирофиляриозом собак, как при моно- так и при микст-инвазии при ИИ $249,6 \pm 4,7$ – $254,8 \pm 5,3$ экз. личинок в мл крови, были установлены явления эритропении, гипергемоглобинемии, лейкоцитоза, эозинофилии, повышение СОЭ по сравнению с группой здоровых собак, содержащихся в одинаковых условиях. Однако все исследуемые показатели не выходили за пределы референтных значений, соответствующих физиологической норме животных данного вида и возраста. Все перечисленные изменения в клиническом статусе крови характерны для гемопаразитозов, и их можно рассматривать как компенсаторный механизм в ответ на гипоксию при дирофиляриозе. При данной инвазии активируются воспалительные и аллергические процессы, которые иллюстрируют нейтрофилия, эозинофилия, лимфопения.

Отечественные и зарубежные исследователи указывают, что у собак, инвазированных разными видами дирофилярий, а также обоими видами одновременно, в биохимическом составе крови наблюдается увеличение уровня мочевины и креатинина на 27% при уменьшении уровня натрия в плазме до 145 ммоль/л – 136 ммоль/л в зависимости от тяжести заболевания. В то время, как показатели АЛТ, билирубин, глюкоза, щелочная фосфатаза мало изменялись [4]. По мнению Л. Ю. Кочетковой с соавт. (2012) [2], у собак с бессимптомным течением дирофиляриоза близкими к норме остаются показатели уровня билирубина, альбумина, АЛТ, АСТ. У собак со средней тяжестью течения уровень альбумина находится или на верхней границе нормы, или на 7 % превышает ее, а общий билирубин повышается на 44 %. Показатели гаммаглутаминтранспептидазы (ГГТП) и щелочной фосфатазы (ЩФ) повышены

на 13–20,3 % и 26,4 % соответственно. У собак со средней тяжестью течения повышение активности АСТ является следствием токсического воздействия на клеточные и субклеточные мембраны. Содержание натрия, калия, кальция, глюкозы и глобулинов изменялось недостоверно по отношению к здоровым животным [1, 3].

Проведенные нами исследования показали, что рост концентрации общего белка связан с синтезом белков острой фазы воспаления, запущенный в ответ на гибель личинок дирофилярий, и представляет собой универсальную защитную реакцию макроорганизма. Повышение концентрации таких показателей крови, как мочевина и креатинин, является отражением дисфункции почек у инвазированных животных. Причем в компонентном составе у больных собак преобладала фракция связанного билирубина. Активность аминотрансфераз связана с продуктами обмена микрофилярий и свидетельствует о патологическом процессе в миокарде и печени. У 68 % собак, пораженных обоими видами дирофилярий, было увеличено количество АЛТ, АСТ в 67 %, мочевины в 78 % случаев. Динамика активности амилазы слабо коррелирует с клиническим состоянием опытных собак, поэтому для характеристики функционального состояния поджелудочной железы необходимо проводить дополнительные исследования. Показатели креатинина были повышены по сравнению с группой здоровых собак в 74 % случаев. Полученные результаты иллюстрируют состояние интоксикации у собак в стадии компенсации. Общий кальций участвует в регуляции проницаемости клеточных мембран, сокращении мышечных волокон и свертываемости крови. Его содержание связано с содержанием фосфора и магния. Изменение содержание калия и натрия связаны с нарушением электролитного баланса.

Установлено, что оба вида дирофилярий одинаково патогенны и затрагивают все системы макроорганизма, а гематологические показатели отражают глубину вовлеченности организма в патологический процесс.

Заключение

Результаты исследований показывают, что в стадии компенсации при отсутствии видимых клинических признаков у инвазированных собак развиваются изменения в гематологическом гомеостазе, как при заражении одним, так и двумя видами дирофилярий. Отклонения в клинических и биохимических показателях крови могут использоваться ветеринарными врачами, как биомаркеры глубины патологических процессов при дирофиляриозе, и определяют необходимость и сроки начала проведения патогенетической терапии.

Список литературы

1. Архипов И. А. Дирофиляриоз / И. А. Архипов, Д. Р. Архипова. М.: Типография Россельхозакадемии. 2004. 194 с.
2. Кочеткова А. Ю. Биохимические аспекты патогенеза при дирофиляриозе собак, вызванного

Dirofilaria immitis: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 06.02.01 / Кочеткова Анастасия Юрьевна. Ставрополь, 2016. 23 с.

3. Нагорный С. А. К вопросу патогенеза при дирофиляриозе собак / С. А. Нагорный, Ю. Г. Бескровная, Ю. И. Васерин // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями: Матер. докл. науч. конф. М., 2008. Выпуск 9. С. 316–319.

4. Серебрякова Н. В. Научное обоснование комплекса мероприятий при дирофиляриозе служебных собак: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03, 03.00.19 / Серебрякова Наталья Валерьевна. Новочеркасск, 2009. 21 с.

5. Schrey C. F. Heartworm disease in cats and dogs – diagnosis and therapy / C. F. Schrey, E. Trautvetter // Waltham Focus. 1998. Volume 8. № 3. P. 23–30.

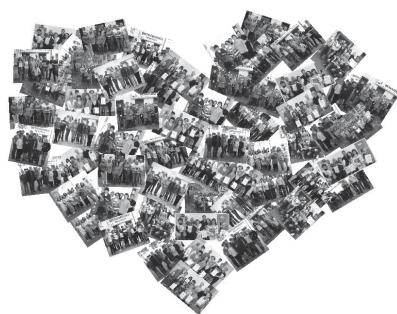
6. Sharma M. C. Blood cellular and biochemical studies in canine dirofilariasis / M.C. Sharma, S.P. Pachauri // Veterinary Research Communications. 1982. Volume 5. № 3. P. 295–300.

7. Stephen J. Key Findings from the 2013 American Heartworm Society Survey / J. Stephen // Today's Veterinary Practice. 2014. Volume 4. № 4. P. 69–71.



ЧОУДПО «ИНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЙ БИОЛОГИИ»
г. Санкт-Петербург

Курсы повышения квалификации



- Ветеринарная кардиология – 4 ступени
- Лабораторная диагностика
- Ветеринарная офтальмология
- Ветеринарная рентгенология – 2 ступени
- Ветеринарная ультразвуковая диагностика – 4 ступени
- Ветеринарная фармация

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

Лицензия Комитета по образованию Санкт-Петербурга на осуществление образовательной деятельности по образовательным программам дополнительного профессионального образования № 1093 от 04.08.2014 г.

DOI: 10.24411/2074-5036-2019-10036

УДК: 619:616.995.121(430.45)

Ключевые слова: *Copepoda*, дефинитивный хозяин, *diphyllobothrium latum*, распространение, дифиллоботриоз, Волгоградская областьKeywords: *Copepoda*, definitive host, *diphyllobothrium latum*, expansion, tapeworm disease, Volgograd region

Каменов К. С., Шинкаренко А. Н.

**ЦИРКУЛЯЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ДИФИЛЛОБОТРИОЗА
НА ТЕРРИТОРИИ ВОЛГОГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ**
*CIRCULATION OF TAPEWORM DISEASE OF CAUSATIVE AGENT
ON THE TERRITORY OF VOLGOGRAD REGION*

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный аграрный университет»

Адрес: Россия, 400002, Волгоград, Университетский пр., 26

*The Volgograd State Agrarian University**Address: Russia, 400002, Volgograd, Universitetsky pr., 26*

Каменов Константин Сергеевич, аспирант

Kamenov Konstantin Sergeevich, post-graduate student

Шинкаренко Александр Николаевич, д. в. н., проф.

Shinkarenko Alexander Nikolaevich, Doctor of Veterinary Sciences, Professor

Аннотация. В природных условиях многие млекопитающие участвуют в циркуляции большинства паразитов. Годовая динамика зараженности плотоядных дифиллоботриозом на территории Волгоградской области за 2015–2018 гг. отражает общее снижение уровня зараженности – в 2015 – 5,8 %, в 2016 – 6,5 %, в 2017 – 4,4 %, в 2018 – 5,2 %. В пресноводных водоемах были выделены веслоногие ракообразные (*Copepoda*) инвазированные процеркоидами лентеца широкого, экстенсивность инвазии в р. Волга – 0,5 %, р. Дон – 0,8 %, р. Ахтуба – 1,1 %. Рыба (промежуточный хозяин), зараженная личиночной стадией лентеца, широко была выловлена в р. Волга, в р. Дон, в речной сети Волго-Ахтубинской поймы: Ахтуба, Старая Ахтуба, Каширин, Бугай. Преимущественно хищные виды: щука (ЭИ составляет от 6,8 до 12 %), судак (ЭИ соответственно от 3,8 до 8,1 %) и окунь (ЭИ от 2,8 до 7,1 %). Модель популяционных границ видового разнообразия дефинитивных хозяев распространения дифиллоботриоза в условиях Волгоградской области имела следующую структуру – енотовидная собака – 21,4 %, лиса – 23,8 %, волк – 12,5 %, собака – 5,7 %, кошка – 4,7 %. С учетом вторичных периодических, экологических факторов был проведен эпизоотологический контроль зараженности собак *Diphyllobothrium latum* на территории Волгоградской области и г. Волгограда. При этом установлено, что дифиллоботриоз регистрировался во все сезоны года, у собак различных пород и типов содержания. У служебных собак и собак, содержащихся в частных питомниках, дифиллоботриоз выявлен не был. Показатель зараженности собак дифиллоботриозом в возрасте от 1 года до 6 лет был самый высокий – 66,3 %. Исследование зараженности собак дифиллоботриозом позволило установить, что собаки домашнего типа содержания подвержены зараженности в меньшей степени – 5,3 %, нежели бродячие собаки – 16,7 %. Дифиллоботриоз регистрировался наиболее часто у собак сельской местности (7,7 %), у городских собак встречался гораздо реже (2,8 %). Самый высокий уровень зараженности собак лентецом широким отмечался на территории Фроловского и Ленинского районов – 12,3 % и 12 %.

Summary. Naturally, many mammals are involved in circulation of parasites. Annual dynamics of contamination of creophagous (zoopagous) by tapeworm disease on the territory of Volgograd region within 2015–2018 reflects total reduction in contamination – in 2015 – 5,8 %, in 2016 – 6,5 %, in 2017 – 4,4 %, in 2018 – 5,2 %. In fresh waters there were found copepods infected by proceroid, invasive extensity in Volga river is up to 0,5 %, Don river is up to 0,8 %, Ahtuba river is up to – 1,1 %. Fish (as a bridging host infected by proceroid was fished out of Volga river, Don river and river system of Volgo-Ahtubinsk flood plain: Ahtuba, the Old Ahtuba, Kashirin, Bugai. Predominantly predatory fish: pike (infestation is up 6,8 to 12 %), pike perch (infestation is up 3,8 to 8,1 %) and perch (infestation is up 2,8 to 7,1 %). The most popular expansion of tapeworm disease among definitive hosts in the territory of Volgograd region is the following: raccoon dog – 21,4 %, fox – 23,8 %, wolf – 12,5 %, dog – 5,7 %, cat – 4,7 %. Taking into consideration secondary periodic and ecological factors, the epizootic control of dogs infected by tapeworm disease (in Volgograd region and Volgograd city) was conducted. It has been established that tapeworm disease has been registered regardless of the dogs' specie or season. Tapeworm disease was not found among service dogs and dogs that live in private kennels. The highest index of tapeworm disease is among dogs aged up 1 year to 6 years by 66,3 %. Investigation of dogs infected by tapeworm disease suggests that domesticated dogs are less subjected to contamination – 5,3 %, compared to stray dogs – 16,7 %. Tapeworm disease is more frequently registered among dogs of rural areas (7,7 %) compared to dogs of urban areas (2,8 %). The highest level of dogs' contamination by tapeworm disease is in the territory of Frolovsky and Leninsky districts – 12,3 % and 12 %.

Введение

Волгоградская область является природно-очаговой территорией по ряду антропо-зоонозных паразитарных инвазий: эхинококкозу, дифиллоботриозу, диروفилляриозу, в структуре которых – заболеваемость местного населения занимает лидирующую позицию. [5, 6] Согласно отчетным данным от 10.04.2018 г. Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) в Российской Федерации в 2017 году было выявлено 4217 случаев дифиллоботриоза (2,8 случаев на 100 тысяч населения). Дифиллоботриоз регистрируется не только на территории Российской Федерации, но и в других странах мира. Наиболее часто случаи дифиллоботриоза отмечены в странах Западной и Центральной Европы, Прибалтике. Данное заболевание достаточно широко распространено, о чем свидетельствуют случаи заражения людей и животных в Африке, Азии, Южной Америке, а также США и Японии. [8, 9, 10]

Основной причиной заражения дифиллоботриозом для животных и человека является зараженная рыба пресноводных водоемов. Ежегодный контроль исследованных проб продуктов переработки рыбы, как и самой рыбы, выявляет паразитов, опасных для человека и животных. В 2017 году этот показатель составил 1,5 %. [5, 6] В России на сегодняшний день одним из лидеров среди паразитов, имеющих дополнительных хозяев (рыба) в цикле своего развития, является лентец широкий (*Diphyllobothrium latum*), который существенно влияет как на развитие биологического загрязнения территорий нашей страны, так и на уровень санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации в целом. [5]

Поэтому индикация межвидового распространения дифиллоботриоза и развитие возбудителя на всех стадиях популяционного и жизненного цикла паразита на территории г. Волгограда и Волгоградской области имеет важное значение.

Цель: Изучить структуру биологических видов в жизненном цикле *Diphyllobothrium latum*.

Материалы и методы

Исследования выполнены в период 2015–2018 гг. в «Центре ветеринарной клинической медицины» Волгоградского государственного аграрного университета, а также согласно данным Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия населения (Роспотребнадзор). За время научной работы обследование было проведено у 3919 собак, 2360 кошек. Вскрытию подвержены 507 трупов собак, 214 трупов кошек, 21 трупов лис, 8 трупов волков, 14 трупов енотовидных собак. Обследование собак и кошек проводили комплексно: общий клинический осмотр животных и лабораторные исследования – анализ кала на яйца проводили по общепринятому флотационному методу Фюллеборна. Вскрытия проводились согласно ГОСТ Р 57547-2017. Патологоанатомическое исследование трупов непродуктивных животных и по методике К. И. Скрябина. Проведение сборов проб в водоемах р. Волга, р. Дон, р. Ахтуба осуществлялись согласно методическим рекомендациям по сбору и обработке материалов при гидробиологических исследованиях на пресноводных водоемах: Зоопланктон и его продукция [4]. Веслоногих ракообразных исследовали компрессорным методом. Паразитологическое исследование рыб проводили по методикам, разработанным В. А. Догелем, Э. М. Ляйманом, А. П. Маркевичем. [1, 3, 4, 9]

Результаты исследований

По результатам мониторинга зараженности дифиллоботриозом собак и кошек, а также диких плотоядных животных Волгоградской области выявлена стабильная тенденция регистрируемых случаев заболевания в различных районах Волгоградской области и г. Волгограда. Годовая динамика зараженности плотоядных имеет выраженный подъем роста с 2015 по 2016 гг., показатели экстенсивности инвазии (ЭИ) в этот период времени были самые высокие. Пиковый период зараженности отмечался в 2016 г. – 6,5 % (таблица 1). После 2016 г. в течение 2 лет установлено замет-

ное снижение уровня заболеваемости собак, кошек, диких плотоядных животных на территории Волгоградской области. Снижение зараженности было зафиксировано в 2017 г., процентный показатель зараженности в этот период составил 4,4 %.

Результаты проведенных исследований дают возможность сделать вывод о том, что в пресноводных водоемах из промежуточных хозяев лентеца широкого особое значение принадлежит веслоногим ракообразным (*Copepoda*). Проведение сборов проб в водоемах р. Волга, р. Дон, р. Ахтуба осуществлялись в период с мая по сентябрь в 2016–2017 гг.

Детекцию видовой принадлежности исследуемых организмов проводили по определителю зоопланктона и зообентоса пресных вод Европейской России в лабораторных условиях.

Интенсивность инвазии (ИИ) *Cyclops strenuus* процеркоидами в исследуемых водоемах составила 1–2 (экз.). Количественный состав циклопов зависел от места сбора проб и сезона года. На более мелководных участках водоемов их количественный состав увеличивался, особенно в летнее время года. Подтверждением наличия благоприятных факторов развития возбудителя дифиллоботриоза в Волгоградской области послужило обнаружение зараженных циклопов в пресноводных водоемах. Самый высокий показатель экстенсивности инвазии циклопов процеркоидами отмечался в р. Ахтуба – 1,1 % (рис. 2).

Одним из факторов циркуляции дифиллоботриоза служит попадание яиц с фекалиями дефинитивного хозяина в водоем, при этом происходит выход корацидий, которых поедают веслоногие рачки (*Copepoda*) – первый промежуточный хозяин. Нами были выделены водоемы Волгоградской области р. Волга, р. Дон, речная сеть Волго-Ахтубинской поймы: Ахтуба, Старая Ахтуба, Каширин, Бугай – неблагоприятные в отношении данного заболевания у таких видов рыб, как окунь, щука, ерш, судак.

Существенной причиной распространения дифиллоботриоза среди дефинитивных хозяев служит зараженная рыба (дополни-

тельный хозяин). Распространенность данного вида заболевания среди дополнительных хозяев выявлена следующая – щука (ЭИ составляет от 6,8 до 12 %), судак (соответственно от 3,8 до 8,1 %) и окунь (от 2,8 до 7,1 %). Паразитологическое исследование рыб проводилось в течение 3 лет (2016–2018 гг.).

Из общей структуры дифиллоботриоза (различных видов животных) были выделены особенности популяционных границ эпизоотического процесса. Таким образом, дифиллоботриоз был зарегистрирован у домашних видов животных: собак, кошек; диких плотоядных: енотовидная собака, лиса, волк. У остальных видов домашних и диких плотоядных дифиллоботриоз выявлен не был. Наименьшая экстенсивность инвазии отмечена у кошек, которая составила 4,7 %. Показатель зараженности лис и енотовидных собак были выше чем у других видов исследуемых животных (рис. 3). Уровень зараженности собак (5,7 %) и волков (12,5 %) был несколько ниже.

Обсуждение результатов

С целью уточнения эпидемиологической роли собак в циркуляции дифиллоботриоза на территории Волгоградской области были проведены исследования вторичных периодических экологических факторов заражения в общей структуре распространения заболевания. Дифиллоботриоз регистрировался во все сезоны года, у собак различных пород и типов содержания.

Согласно данным, представленным на рисунке 4, степень зараженности собак *Dipyllobothrium latum* изменялась вместе с возрастом. Было установлено, что дифиллоботриоз встречался у собак следующих возрастных групп: от 6 лет и старше, от 1 года до 6 лет, до 1 года, но собаки средней возрастной группы были повержены заболеванию в большей степени (рис. 4). У собак этой возрастной группы показатель зараженности в процентном соотношении с другими очень высокий – 66,3 %. Инвазированность собак возраста старше 6 лет – 24,7 %. Данный показатель свидетельствует

о менее выраженной встречаемости лентеца широкого (*Diphyllobothrium latum*) у собак этой возрастной группы относительно других. Интенсивность инвазии при наблюдении собак находилась в пределах 1–4 экз.

Выраженное изменение динамики зараженности собак дифиллоботриозом отмечено при сопряженном анализе безнадзорной и домашней популяции. Экстенсивность инвазии безнадзорных собак значительно выше, чем у домашних. В группу домашних собак были также включены служебные. Результаты исследования собак по типу содержания представлены на рисунке 5.

У служебных собак и собак, содержащихся в частных питомниках, дифиллоботриоз выявлен не был.

По результатам исследований дифиллоботриоз регистрировался у собак как в городской, так и в сельской местности. Высокий уровень инвазии собак сельской местности был ожидаем и составил 7,7 %, в отличие от городских – 2,8 %.

Мониторинг заболеваемости собак дифиллоботриозом проводился на территории г. Волгограда и 5 районов Волгоградской области в течение трех лет. За время контроля в четырех районах области наблюдалась стабильная динамика заболеваемости собак. По результатам зонирования территорий по степени риска заражения было выделено 2 района Волгоградской области с высокой инвазированностью собак (рис. 7), также зарегистрированы случаи дифиллоботриоза собак в Михайловском районе и г. Волгограде, что свидетельствует о неблагоприятии этих населенных пунктов в отношении данного заболевания. На территории Ольховского района случаев дифиллоботриоза собак выявлено не было.

Роль человека в поддержании цикла развития лентеца широкого подкрепляется достаточно большим перечнем научных работ, в связи с этим было очевидным изучение влияния человека в общей структуре распространения заболевания в условиях Волгоградской области. В рамках проведения научно-исследовательской работы были рассмотрены отчетные данные

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Волгоградской области». Согласно сведениям по заболеваемости дифиллоботриозом (вх. №34-20/270-19 от 17.01.19 г. за 2014–2018 гг.) с разбивкой по территориям, в Волгоградской области за этот период времени было выявлено 87 случаев дифиллоботриоза человека, общий показатель заболеваемости составил 3,40 на 100 тыс. населения, общее снижение заболеваемости отмечено также и в годовой динамике контроля заболеваемости населения с 2017 по 2018 г., максимальные значения уровня заболеваемости приходятся на 2014 г. (рис. 7)

Ранжирование территорий Волгоградской области по степени риска заражения дифиллоботриозом выявило 5 районов области: Быковский (30,51), Ленинский (13,04), Старополтавский (20,80), Светлоярский (13,46), Среднеахтубенский (8,46), с более высоким уровнем заражения населения. В Городищенском, Дубовском, Жирновском, Николаевском, Палласовском районах области количество зарегистрированных случаев заболеваемости людей было несколько ниже. Случаев дифиллоботриоза людей не было выявлено в Иловлинском, Михайловском, Фроловском, Ольховском районах Волгоградской области (рис. 8).

Показатели заболеваемости людей в городах Волгоград, Волжский, Камышин в сравнительном аспекте ниже, чем в районах области. Общее количество случаев дифиллоботриоза людей на долю городского населения составило 54.

В рамках научно-исследовательской работы были проведены социологические опросы среди жителей 5 районов Волгоградской области и г. Волгограда, г. Волжского, г. Камышина, по результатам которых 5 % опрошенных отмечали отхождение члеников неизвестного паразита. Со слов опрошенных, причиной необращения к медицинским специалистам послужило избавление от недуга при помощи применения антигельминтных препаратов широкого спектра действия в домашних условиях.

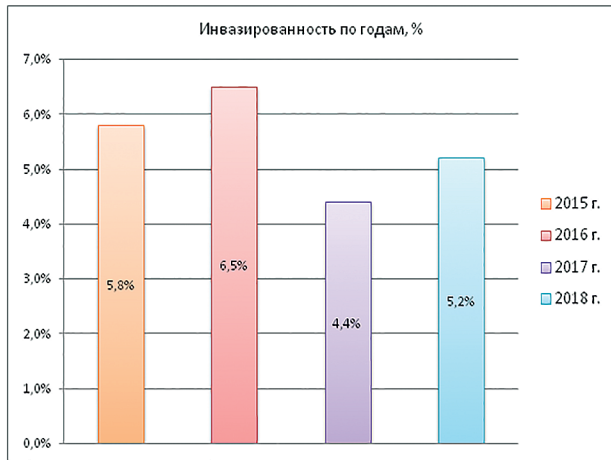


Рисунок 1 – Динамика зараженности плотоядных *Diphyllobothrium latum* на территории Волгоградской области за 2015 – 2019 гг.

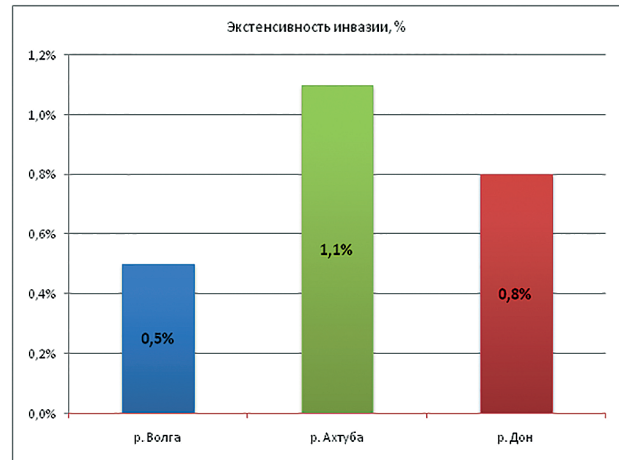


Рисунок 2 – Зараженность циклопов процеркоидами в водоемах Волгоградской области за 2016–2017 гг.

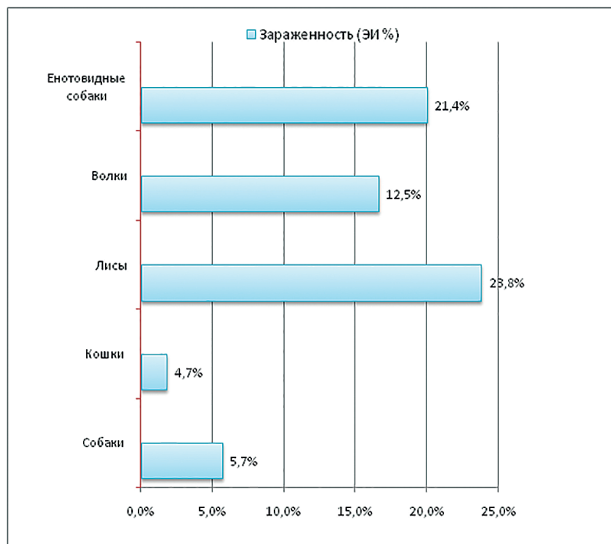


Рисунок 3 – Структура популяционных границ (видового) распространения дифиллоботриоза

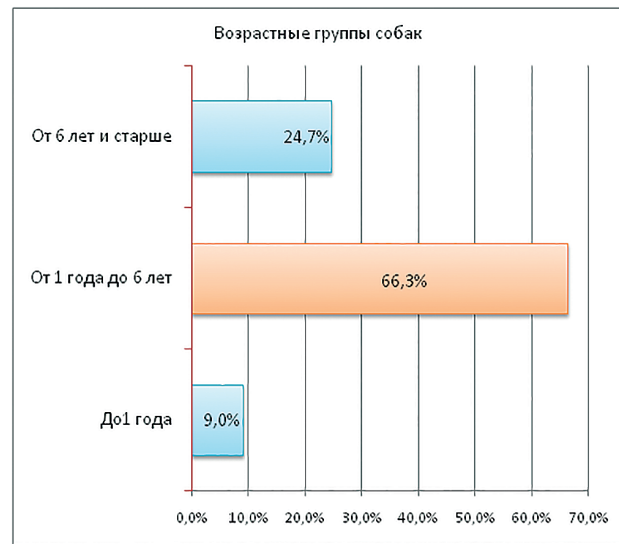


Рисунок 4 – Зараженность *Diphyllobothrium latum* на территории Волгоградской области собак различных возрастных групп за 2015–2018 гг.

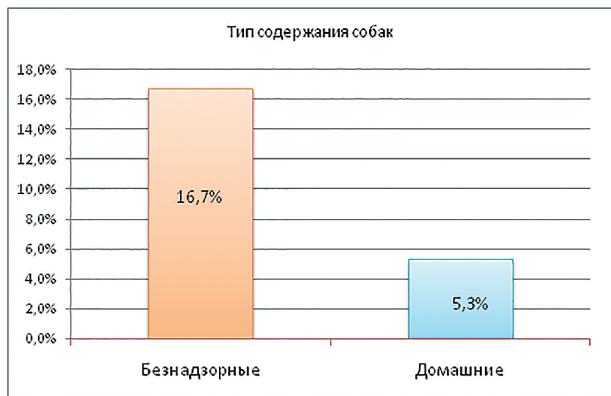


Рисунок 5 – Инвазированность собак *Diphyllobothrium latum* в разных группах по типу содержания в условиях Волгоградской области за 2015–2018 гг.

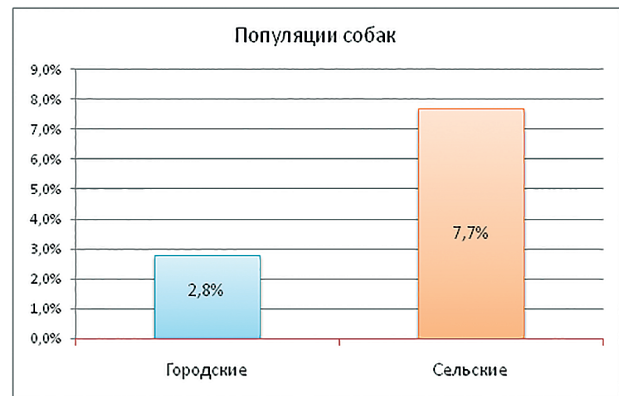


Рисунок 6 – Инвазированность собак в городской и сельской местности на территории г. Волгограда и Волгоградской области за 2015–2018 гг.

Заклучение

На территории Волгоградской области возможный риск заражения людей и животных дифиллоботриозом связан с обнаружением в водоемах р. Волга, р. Дон, речной сети Волго-Ахтубинской поймы: Ахтуба, Старая Ахтуба, Каширин, Бугай существенного числа зараженной рыбы у следующих видов: окунь, щука, ерш, судак. Циркуляция возбудителя дифиллоботриоза подтверждается наличием зараженных веслоногих ракообразных (*Sorperoda*) процеркоидами в водоемах р. Ахтуба (1,1 %), р. Волга (0,5 %), р. Дон (0,8 %).

Значительное влияние в распространении дифиллоботриоза в Волгоградской области оказывают домашние и дикие плотоядные животные, в частности собаки. Паразиты половозрелой стадии были выявлены у кошек, собак, лис, енотовидных собак, волков. Динамика инвазивности собак в разрезе вторичных периодических, экологических факторов в Волгоградской области в целом имеет стабильную оценку в течение трех лет. На зараженность собак дифиллоботриозом влияет не порода, а тип содержания, возможное хозяйственное назначение. Так уровень инвазии собак сельской местности был значительно выше городской и составил 7,7 %. Зараженность собак *Diphyllobothrium latum* по районам области позволила выявить, что на территории Фроловского и Ленинского районов риск заражения собак самый высокий. Экстенсивность инвазии собак в Фроловском и Ленинском районах была значительно выше – 12,3 % и 12 %.

По данным «Центра гигиены и эпидемиологии Волгоградской области» у населения Волгоградской области ежегодно выявляются случаи заболеваемости дифиллоботриозом. Большой уровень заселенности территорий близ берегов водоемов Волгоградской области, вместе с проблемой сточных вод определяют человека как важный фактор в распространении дифиллоботриоза на территории области.

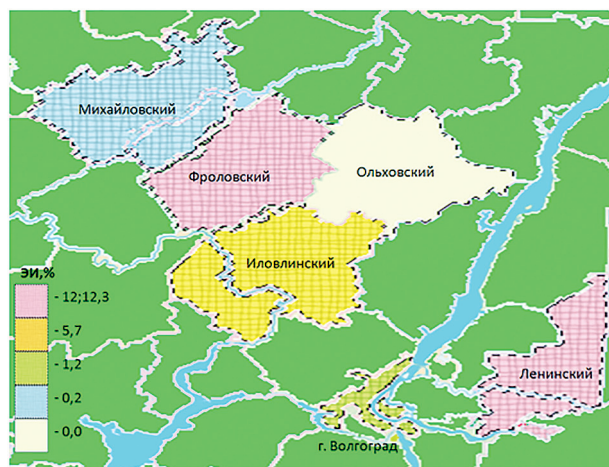


Рисунок 7 – Зонирование территории Волгоградской области по уровню заболеваемости дифиллоботриозом

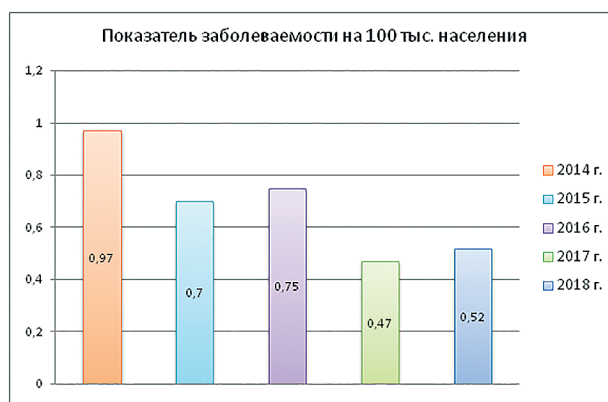


Рисунок 8 – Годовая динамика заболеваемости дифиллоботриозом (по контингенту все жители количество / показатель) на территории г. Волгограда и Волгоградской области в 2014–2018 гг.

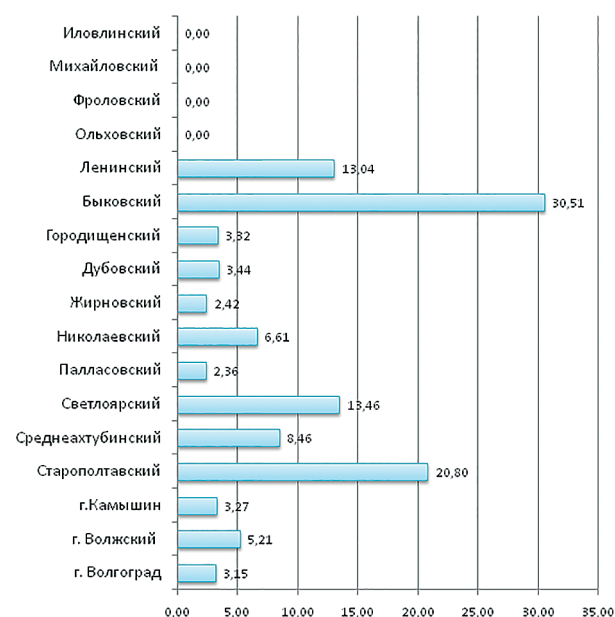


Рисунок 9 – Динамика заболеваемости населения дифиллоботриозом за январь – декабрь 2014–2018 гг. г. Волгограда и Волгоградской области

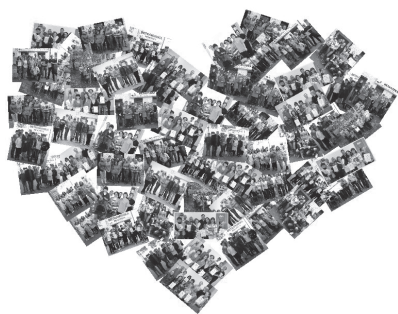
Список литературы

1. ГОСТ Р 57547-2017 Услуги для непродуктивных животных. Патологоанатомическое исследование трупов непродуктивных животных. Общие требования [Электронный ресурс]. М.: Стандартинформ, 2017. 15 с. Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200146266>.
2. Атаев А. М. Ихтиопатология / А. М. Атаев, М. М. Зубаирова. М.: Лань, 2015. 368 с.
3. Быховская-Павловская И. Е. Паразитологические исследования рыб / И. Е. Быховская-Павловская. Л.: Наука, 1969. 108 с.
4. Методические рекомендации по сбору и обработке материалов при гидробиологических исследованиях на пресноводных водоемах: Зоопланктон и его продукция / Гос. НИИ озер. и реч. рыб. хоз-ва, АН СССР, Зоол. ин-т; [Сост. А. А. Салазкин и др.]. Л.: ГосНИОРХ, 1984. 33 с.
5. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2016 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2017. 220 с.
6. Чумаченко П. А. Эколого-эпидемиологическая характеристика очагов дифиллоботриозов на территории иркутской области: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08 / Чумаченко Павел Андреевич. Иркутск, 2016. 126 с.
7. Шинкаренко А. Н. Зараженность хищных рыб водоемов Волгоградской области / А. Н. Шинкаренко, С. Н. Федоткина // Теория и практика паразитарных болезней животных. 2014. № 15. С. 351–354.
8. Ikuno H. Epidemiology of *Diphyllobothrium nihonkaiense* Diphyllobothriasis, Japan, 2001–2016 / H. Ikuno, S. Akao, H. Yamasaki // Emerging Infectious Diseases CME. 2018. 24(8). P. 1428–1434.
9. Jimenez J. A. Prevalence of *Diphyllobothrium latum* (Cestoda: *Diphyllobothriidae*) plerocercoids in fish species from four Italian lakes and risk for the consumers / J. A. Jimenez, S. Rodriguez, R. Gamboa, L. Rodriguez, H. H. Garcia // The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2012. 87(5) P. 897–901.
10. Rivero M. R. *Diphyllobothrium* sp. in *Canis famisis* of the Argentine subtropical region / M. R. Rivero, C. E. Motta, M. M. Salas, A. Chiaretta, O. D. Salomon // Argentine Journal of Microbiology. 2015. 3(47). P. 196–200.



ЧОУДПО «ИНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЙ БИОЛОГИИ»
г. Санкт-Петербург

Курсы повышения квалификации



- Ветеринарная кардиология – 4 ступени
- Лабораторная диагностика
- Ветеринарная офтальмология
- Ветеринарная рентгенология – 2 ступени
- Ветеринарная ультразвуковая диагностика – 4 ступени
- Ветеринарная фармация

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

Лицензия Комитета по образованию Санкт-Петербурга на осуществление образовательной деятельности по образовательным программам дополнительного профессионального образования № 1093 от 04.08.2014 г.

DOI: 10.24411/2074-5036-2019-10037

УДК: 616.995.1:599.735.31:599.742

Ключевые слова: гельминты, северные олени, пушные звери

Keywords: helminthes, reindeer, fur-bearing animals

Логинова О. А., Кузнецов Ю. Е., Белова Л. М., Ширяева В. А.

КОПРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ГЕЛЬМИНТОЗОВ ПОЛУДИКИХ ЖИВОТНЫХ: ИСТОЧНИКИ ОШИБОК ПЕРВОГО И ВТОРОГО РОДА

COPROLOGICAL DIAGNOSTICS OF HELMINTHOSES IN SEMIWILD ANIMALS: TYPE I AND TYPE II ERROR SOURCES

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»

Адрес: 196084, Россия, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5

Saint Petersburg State Academy of Veterinary Medicine

Address: 196084, Russia, Saint Petersburg, Chernigovskaya str., 5

Логинова Ольга Александровна, канд. вет. наук, ассистент кафедры паразитологии им. В. Л. Якимова.

E-mail: loginova_spb@bk.ru. Тел.: +7(950) 029-54-37

Loginova Olga Alexandrovna, PhD of Veterinary Science, Assistant of the Dept. of Parasitology.

E-mail: loginova_spb@bk.ru. Tel.: +7(950)029-54-37

Кузнецов Юрий Евгеньевич, канд. вет. наук, ассистент кафедры паразитологии им. В. Л. Якимова.

E-mail: fish2017@yandex.ru. Тел.: +7(965) 777-55-00

Kuznetsov Yury Yevgen'evich, PhD of Veterinary Science, Assistant of the Dept. of Parasitology.

E-mail: fish2017@yandex.ru. Tel.: +7(965)777-55-00

Белова Лариса Михайловна, д. биол. наук, зав. каф. паразитологии им. В. Л. Якимова.

E-mail: larissabelova2010@yandex.ru. Тел.: +7(921)301-35-03

Belova Larisa Mikhajlovna, Doctor of Biology Science, Head of the Dept. of Parasitology.

E-mail: larissabelova2010@yandex.ru. Tel.: +7(921)301-35-03

Ширяева Вера Александровна, канд. вет. наук, доцент кафедры паразитологии им. В. Л. Якимова.

E-mail: shirochka07@mail.ru. Тел.: +7(921) 773-76-63

Shiryayeva Vera Alexandrovna, PhD of Veterinary Science, Associate Professor of the Dept. of Parasitology.

E-mail: shirochka07@mail.ru. Tel.: +7(921)773-76-63

Аннотация. Понятия ошибок первого и второго рода были сформулированы для математической статистики, но они используются и в других областях, когда при принятии бинарного решения на основании некоего критерия есть вероятность получить ложный результат. В лабораторной диагностике гельминтозов качественными копрологическими методами таким критерием служит морфология возбудителя. На примере многолетнего исследования фекалий северных оленей и пушных зверей в лаборатории по изучению паразитарных болезней СПбГАВМ показано при копрологической диагностике гельминтозов полудиких животных источниками ошибок первого рода могут быть: 1) псевдопаразиты – объекты живой и неживой природы, такие как волоски животных, растительные фрагменты и прочее; 2) ложные паразиты (появляющиеся как из-за погрешностей протокола исследования на преддиагностическом этапе, так и из-за особенностей диеты исследуемого животного). Источниками ошибок второго рода могут быть: 1) полиморфизм возбудителей; 2) деформация паразитов во время исследования.

Summary. The concept of the I and II type errors was formulated for mathematical statistics, but is of use in other areas, when making a binary decision based on a certain criterion is likely to get a false result. The morphology of the pathogen serves as this criterion in the laboratory diagnosis of helminthoses using qualitative coprological methods. Using the examples of a long-term studies of reindeer and fur-bearing animals feces in the Laboratory for the Study of Parasitic Diseases at the St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, it is shown, that in coprological diagnostics of helminthoses of semiwild animals, the sources of the I type errors can be: 1) biotic and abiotic objects (such as animal hair, plant fragments, etc); 2) spurious parasites (appearing both because of the errors of the study protocol at the pre-diagnostic stage, and because of the peculiarities of the diet of the studied animal). Sources of II type errors can be: 1) polymorphism of pathogens; 2) deformation of parasites during the study.

Введение

Понятия ошибок первого и второго рода изначально были сформулированы для сферы математической статистики [1]. Однако ими оперируют и в других областях знания, когда при принятии бинарного решения на основании некоего критерия есть вероятность получить ложный результат. В лабораторной диагностике гельминтозов качественными копрологическими методами таким критерием служит морфология возбудителя. Задача исследователя – определить, является ли обнаруженный в фекалиях объект паразитом, присущим данному дефинитивному хозяину, или нет. В таком случае ошибка первого рода ведёт к ложноположительному результату, когда за паразита принимают объект иной природы. А ошибка второго рода – к ложноотрицательному, когда истинно паразитический организм не идентифицируется исследователем как таковой. Диагностика гельминтозов полудиких животных копро-

логическими методами имеет свои особенности, о которых мы расскажем подробнее, дабы предостеречь наших коллег от совершения подобных ошибок и для повышения точности проводимых исследований.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили фекалии северных оленей (*Rangifer tarandus* Linnaeus, 1758) и пушных зверей – норок (*Mustela lutreola* Linnaeus, 1761; *Neovison vison* Schreber, 1777), песцов (*Vulpes lagopus* Linnaeus, 1758), лисиц (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) и енотовидных собак (*Nyctereutes procyonoides* Gray, 1834), исследованные в лаборатории по изучению паразитарных болезней на базе кафедры паразитологии им. В. Л. Якимова ФГБОУ ВО СПбГАВМ в период с 2009 по 2019 годы. Копрогельминтоскопию проводили методом осмотра фекалий; копролярвоскопию – методами Вайда и Бермана-Орлова; копро-

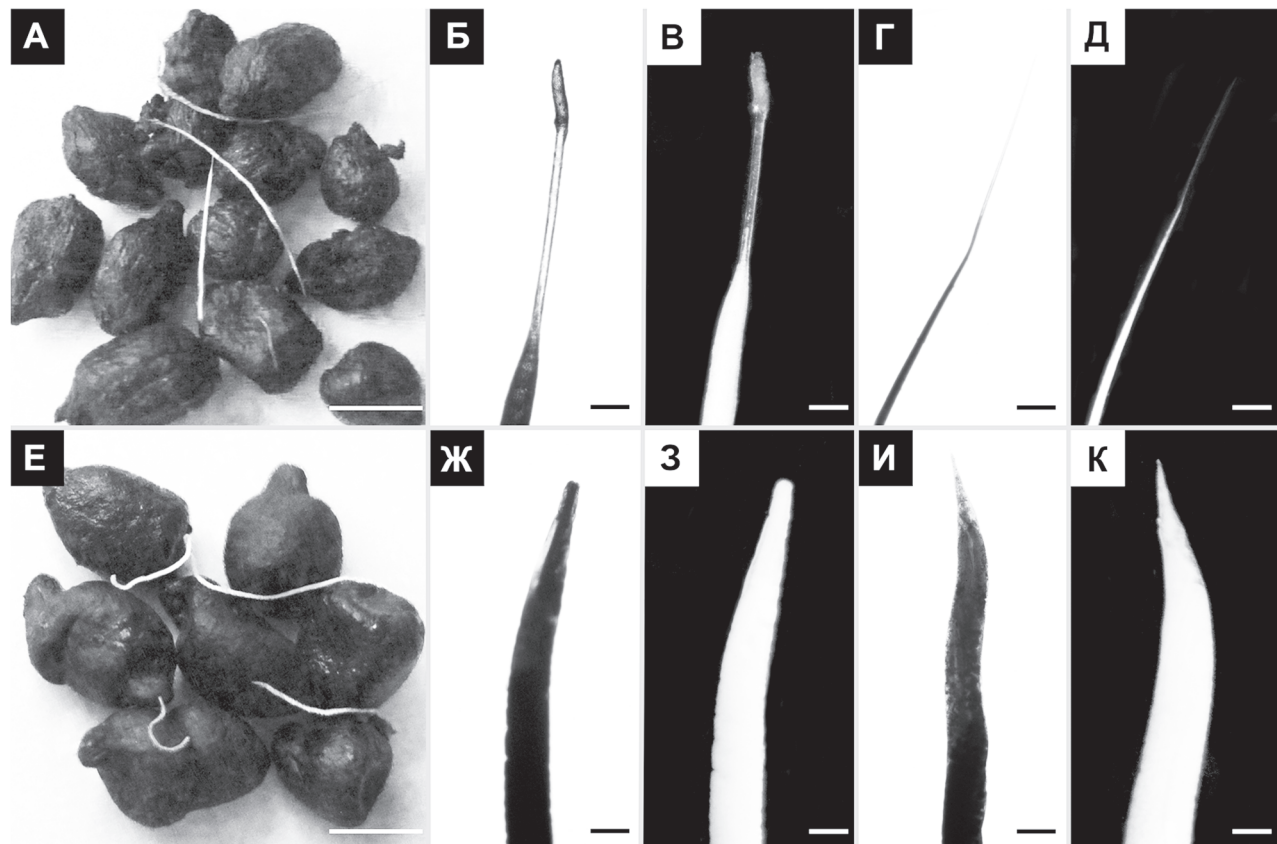


Рис. 1. Нитевидные объекты в фекалиях северных оленей: А – внешний вид фекалий с несколькими волосками оленя; Б и В – корневая часть волоска; Г и Д – дистальная часть волоска; Е – внешний вид фекалий с несколькими нематодами отряда Strongylida; Ж и З – краниальный конец гельминта; И и К – каудальный конец гельминта. А и Е – деление шкалы равно 1 см; Б-Д, Ж-К – световая микроскопия методом светлого и тёмного поля, деление шкалы равно 0,5 мм, увеличение x4 по объективу. Фото: О. А. Логинова.

овоскопию – флотационными (Дарлинга – оригинальный и усовершенствованный [2]) и седиментационными (Демидова) методами. Для световой микроскопии полученных временных препаратов методом светлого поля применяли микроскопы Микмед-6 (ЛОМО), Микротон-200М (Петролазер), методом тёмного поля – МБС-10 (ЛОМО). Фоторегистрацию осуществляли при помощи зеркальной фотокамеры EOS D Mark II (Canon), камеры смартфона Xperia XA2 (SONY) и камеры смартфона Mi MIX 2 (Xiaomi).

Результаты исследований

При осмотре фекалий северных оленей встречались белесые эластичные нитевидные объекты длиной от 0,5 до 2 см (Рис. 1).

При проведении копролярво- и копроовоскопии в материале от северных оленей обнаруживали личинок нематод и сходные с ними объекты (Рис. 2).

Кроме того, наряду с типичными яйцами нематод в фекалиях северных оленей улавливали объекты, напоминающие таковые по ряду признаков (форма, размер, строение), но не полностью соответствовавшие им (Рис. 3 и 4).

В фекалиях молодняка норок были обнаружены яйца гельминтов, идентифицированные по их строению и размерам как *Toxascaris leonina* [3, 4] (Рис. 5).

Обсуждение результатов

Эластичные нитевидные белёдые объекты, обнаруженные в фекалиях северных оленей, могут быть как паразитическими кишечными нематодами отряда *Strongylida*, так и волосками из шерстного покрова животных (Рис. 1А и Е). Примечательно, что такие волоски, оказавшись во влажной среде, теряют упругость, но приобретают эластичность. Таким образом, они напоминают паразитических червей не только по размерам, цвету и форме, но и на ощупь. Для дифференциальной диагностики этих объектов достаточно провести их микроскопию (Рис. 1 Б-Д, Ж-К).

Напомянуть гельминтов в фазе личинки могут и растительные фрагменты (Рис. 2). Однако они никогда не будут обладать свой-

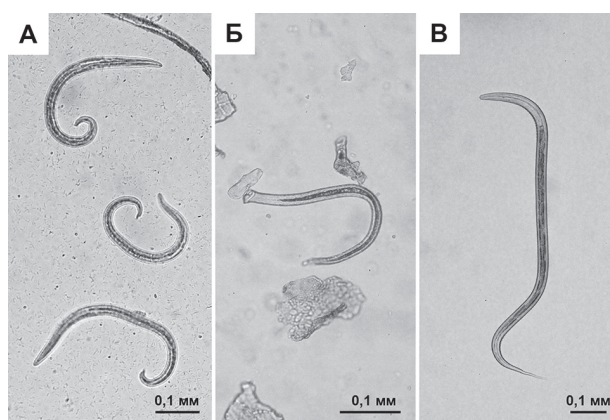


Рис. 2. Световая микроскопия методом светлого поля временных препаратов из фекалий северных оленей: А – личинки первого возраста мозговой нематоды *Elaphostrongylus rangiferi* (каудальные концы загнуты, снабжены шипиками); Б – растительный фрагмент; В – личинка третьего возраста кишечной нематоды рода *Trichostrongylus* (краниальный конец обращён вверх), увеличение $\times 20$ по объективу. Фото: О. А. Логинова.

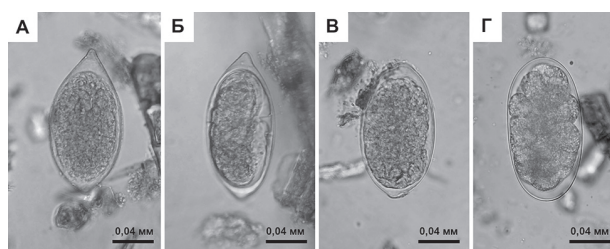


Рис. 3. Объекты из фекалий северных оленей, идентифицированные как яйца кишечных нематод отряда *Strongylida*: А – яйцо с нетипичными заострениями на полюсах, обнаруженное при седиментации; Б – то же, обнаруженное флотационным методом; В – то же, но заострения на полюсах менее выражены; Г – типичное яйцо для сравнения, световая микроскопия методом светлого поля, увеличение $\times 40$ по объективу. Фото: О. А. Логинова.

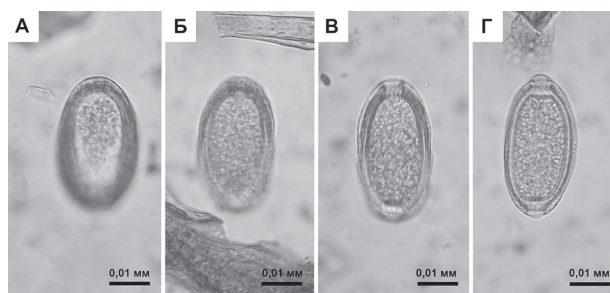


Рис. 4. Объекты из фекалий северных оленей, идентифицированные как яйца кишечных нематод рода *Capillaria*: А – яйцо без характерных выпячиваний на полюсах; Б – то же, но оболочка не столь однородна; В – типичное яйцо при том же ракурсе, с фокусировкой только на одном полюсе; Г – типичное яйцо для сравнения, световая микроскопия методом светлого поля, увеличение $\times 40$ по объективу. Фото: О. А. Логинова.

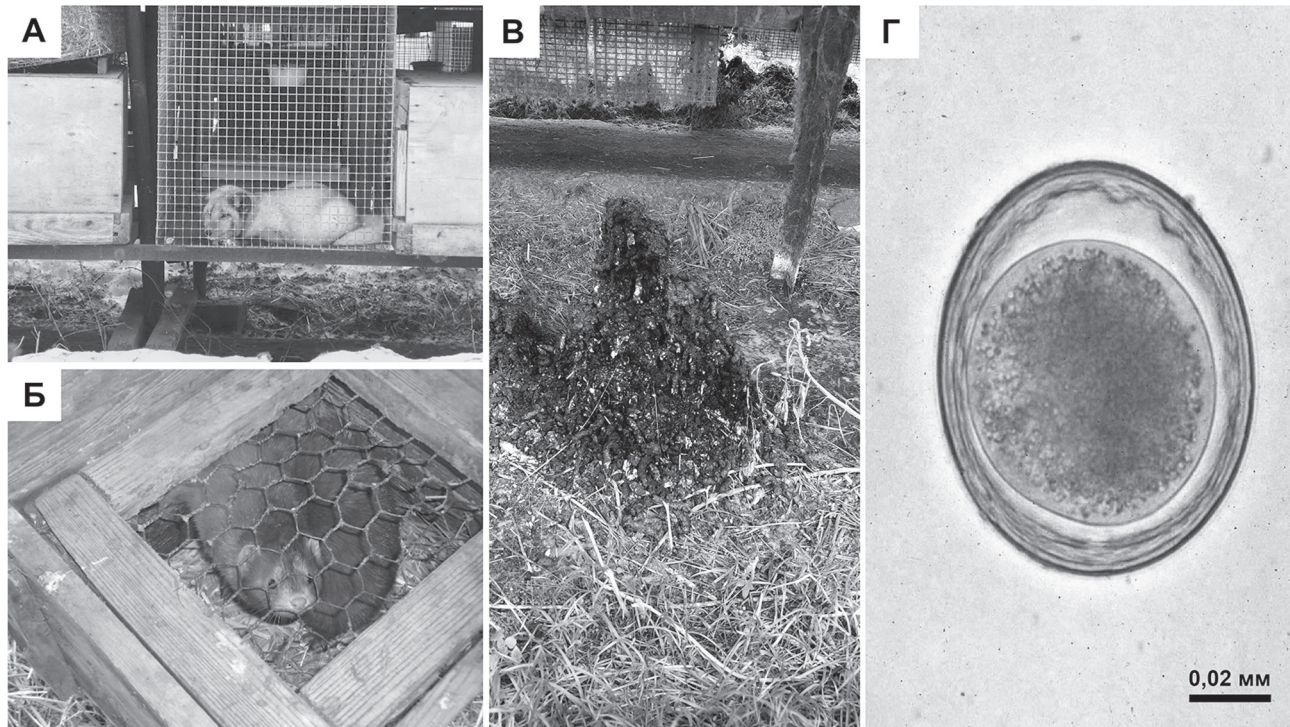


Рис. 5. Обследование пушных зверей на гельминтозы: А – песец в клетке (шеде); Б – норка в клетке; В – фекалии пушных зверей на земле под шедом; Г – яйцо *Toxascaris leonina*, световая микроскопия методом светлого поля, увеличение $\times 40$ по объективу. Фото: Ю. Е. Кузнецов.

ством подвижности. Кроме того, более тщательное изучение их внутренних структур, особенно на терминальных участках, поможет в их корректной идентификации. Подобные объекты принято называть псевдопаразитами (*pseudoparasites*).

Что касается нематодных яиц с нетипичными выпячиваниями (Рис. 3) или, напротив, отсутствием таковых (Рис. 4), то причинами тому могут служить как природный полиморфизм яиц, так и деформация яиц в процессе обнаружения. В отношении яиц с нехарактерными заострениями более вероятной представляется версия полиморфизма, так как такие яйца были обнаружены и седиментационными, и флотационными методами, что минимизирует вероятность воздействия на них процедуры исследования. Вопрос о причинах полиморфизма следует считать открытым. Он может быть как естественным (динамичность эволюционных процессов: закрепление/изменение признака), так и противоестественным (в результате воздействия на самку антигельминтных препаратов).

Случай с выявлением яиц *T. leonina* в материале от норок наглядно иллюстрирует особенности работы с копрологией полудиких

животных (Рис. 5). Получить от них материал ректально на практике не представляется возможным. Животные содержатся в специальных клетках (шедах), размещённых выше уровня земли и снабжённых сетчатым полом, чтобы экскременты, падая, оставляли шед максимально чистым (Рис. 5В). Поэтому для исследования собирают свежевыделенные фекалии с самой верхней части той массы, что скапливается под шедом. Поскольку считается, что *T. leonina* не паразитирует у норок, было необходимо либо пересмотреть этот постулат, либо выявить источник ошибки. В результате было установлено, что в тех клетках, где в момент отбора проб находился молодняк норок, ранее содержались песцы, заражённые токсамаскариозом. После того, как животных пересадили, экскременты с земли убрали, но не слишком тщательно. Таким образом, при отборе проб тонкий слой фекалий молодняка норок смешался с остатками нижележащего слоя фекалий песцов. Истинно паразитические объекты, обнаруживаемые у определённого животного, но не свойственные для него, принято называть ложными паразитами (*spurious parasites*).

Примечательно, что паразиты животных-жертв встречаются не только в экскрементах животных-хищников (например, пушных зверей), но и у северных оленей. Суровые условия обитания и скудность кормовой базы вынуждают оленей поедать мелких грызунов (леммингов), а также рыбу, которой их иногда подкармливают оленеводы [6]. Не стоит забывать, что появлению псевдопаразитов способствует и копрофагия, которая может возникать как при недостатке корма, так и вследствие извращения аппетита, вызванного болезнью.

Заключение

Таким образом, при копрологической диагностике гельминтозов полудиких животных источниками ошибок первого рода могут быть: 1) псевдопаразиты – объекты живой и неживой природы, такие как волоски животных, растительные фрагменты и прочее [5]; 2) ложные паразиты (появляющиеся как из-за погрешностей протокола исследования на предиагностическом этапе, так и из-за особенностей диеты исследуемого животно-

го). Источниками ошибок второго рода могут быть: 1) полиморфизм возбудителей; 2) деформация паразитов во время исследования.

Список литературы

1. ГОСТ Р 50779.10-2000. Статистические методы. Вероятность и основы статистики. Термины и определения. Введ. 29.12.00. Москва: Изд-во стандартов, 2001. 46 с.
2. Белова Л. М. Новая универсальная флотационная жидкость для комплексных лабораторных исследований / Л. М. Белова, Н. А. Гаврилова, Д. Н. Пудовкин [и др.] // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2012. № 4(1). С. 15–17.
3. Кузнецов Ю. Е. Кишечные паразитозы пушных зверей в хозяйствах Ленинградской области: автореф. дис. ... канд. вет. наук : 03.02.11 / Ю. Е. Кузнецов. СПбГАВМ. СПб., 2012. 22 с.
4. Кузнецов, Ю. Е. Кишечные паразитозы пушных зверей в хозяйствах Ленинградской области: дис. ... канд. вет. наук: 03.02.11 / Ю. Е. Кузнецов. СПбГАВМ. – СПб., 2012. – 172 с.
5. Логинова О. А. Гельминтооовоскопия: опыт дифференциальной диагностики яиц гельминтов и имитирующих их объектов / О. А. Логинова, Л. М. Белова // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2015. № 3 (27). С. 44–47.
6. Наземные и морские экосистемы: сб. статей / ред. Г. Г. Матишов и А. А. Тишков. М.: Паулсен, 2011. 445 с.

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 2019 г. согласно инф. письму б/н от 03.09.18 г. НДС не облагается. Адрес подписки: ...»

Стоимость редакционной подписки на 2019 год:

2000 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.invvetbio.spb.ru

DOI: 10.24411/2074-5036-2019-10038

УДК 579.62:639.3.09

Ключевые слова: мониторинг, антибиотикорезистентность, аквакультура, миксобактерии, йерсинии, бактериальная почечная болезнь, *Renibacterium salmoninarum*.

Keywords: monitoring, antibiotic resistance, aquaculture, mixobacteria, Yersinia, bacterial kidney disease, *Renibacterium salmoninarum*.

Дрошнев А. Е., Завьялова Е. А., Булина К. Ю.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ В СЕВЕРО-ЗАПАДНОМ РЕГИОНЕ
MICROBIOLOGICAL MONITORING OF VIRUSES OF SALMONID FISHES IN THE NORTH-WEST REGION

ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН»

Адрес: 104208, Москва, Рязанский пр., 24, к. 1.

Federal State Budget Science Institution «Federal Scientific Centre VIEV»

Adress: 109428, Moscow, Rjazanskij prospekt, d.24, k.1

Дрошнев Алексей Евгеньевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории ихтиопатологии. E-mail: asdf1961@mail.ru. Тел.: +7(495)995-88-61

Droshnev Aleksey Evgen'evich, PhD of Biology Science, senior researcher of Laboratory of Ichthyopathology.

E-mail: asdf1961@mail.ru. Tel.: +7(495)995-88-61

Завьялова Елена Александровна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией ихтиопатологии.

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

Zavyalova Elena Alexandrivna, PhD in Biology Science, head of Laboratory of Ichthyopathology.

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

Булина Кристина Юрьевна, младший научный сотрудник лаборатории ихтиопатологии.

Тел.: +7(495)995-88-61

Bulina Kristina Yur'evna, researcher of Laboratory of Ichthyopathology.

Tel.: +7(495)995-88-61

Аннотация. Проведен микробиологический мониторинг лососевых рыб, выращиваемых в аквакультуре Северо-Западного региона страны. Выполнено 442 исследования, выделено 235 этиологически значимых штаммов микроорганизмов. Наиболее часто от лососевых рыб высеивается грамотрицательная микрофлора – йерсинии, миксобактерии, псевдомонады, обладающая высокой чувствительностью к препаратам цефалоспоринового и фторхинолонового рядов, а также хлорамфениколу и резистентная к фуразолидону, пиперациллину, канамицину, амикацину, азтреонаму. Впервые в стране описан случай выделения в аквакультуре грамположительных бактерий *Renibacterium salmoninarum* и изучена их антибиотикорезистентность. В марикультуре при массовой гибели из внутренних органов и жаберного аппарата рыб выделяли микроорганизмы *Flexibacter branchiophila* (*Flavobacterium branchiophilum*) с сопутствующей кокковой микрофлорой; их антибиотикорезистентность представляет теоретическую значимость, так как в условиях крупных морских рыбоводных комплексов проводить терапию физически невозможно. Применение лекарственных препаратов во всех случаях должно быть основано на результатах бактериологического исследования, а стратегия борьбы с болезнями основываться на мировом опыте вакцинопрофилактики.

Summary. The study concerned the microbiological monitoring of salmonid fishes, grown in the aquaculture of the North-West region of the country. 442 studies were performed, 235 etiologically significant strains of microorganisms were revealed. Most often salmonid fishes are infected by the gram-negative microflora – yersinia, mixobacteria, pseudomonades, having the high sensibility to substances of cephalosporin and fluroquinolone ranges, as well as to chloramphenicol and resistant to furazolidone, piperacillin, kanamycin, amikacin, aztreonam. First-time is detection of such gram-positive bacteria as *Renibacterium salmoninarum* in the aquaculture of the country is described; its resistance to antibiotics has been studied. In the marine culture during the mass mortality such microorganisms as *Flexibacter branchiophila* (*Flavobacterium branchiophilum*) with the accompanying coccal microflora were found in internal organs and the gill apparatus of fishes; its resistance to antibiotics is theoretically significant, as it is physically impossible to carry out the therapy under the conditions of large scale sea fish breeding complexes. In all cases pharmaceuticals can be applied basing on results of bacteriologic studies, and the disease fighting strategy should be based on the global experience of vaccine prophylactics.

Введение

С каждым годом мировой спрос на продукцию аквакультуры возрастает все сильнее, что в свою очередь стимулирует развитие отрасли. Обеспечение достаточного количества и высокого качества рыбной продукции возможно только в условиях использования современных технологий, сочетающих использование открытых водоемов и погружных садков. Для интенсивного выращивания необходимо увеличение плотности гидробионтов до 40 кг на 1 кубический метр и выше. Несомненные плюсы высоких плотностей выращивания: технологичность и удобство рыбоводных процессов, уравниваются серьезной опасностью развития инфекционных болезней, особенно бактериальных, и ухудшением санитарно-гигиенических условий содержания гидробионтов.

По сведениям Ассоциации «Росрыбхоз» выращивание товарной рыбы за последние годы в субъектах Российской Федерации возросло с почти 135,5 тыс. тонн в 2012 году до более 173,6 тыс. тонн в 2016 году. Лидером в отрасли является Южный федеральный округ – 63,5 тыс. тонн, на втором месте – активно развивающийся Северо-Западный федеральный округ – 37,2 тыс. тонн продукции аквакультуры, которая является приоритетным направлением сельского хозяйства региона.

Наращивание объемов производства, активная торговля рыбопосадочным материалом между областями и странами, увеличение плотности посадки и количества хозяйств в локальных акваториях неизбежно сопровождается возникновением бактериальных болезней. Для купирования заболеваний, а в ряде случаев и с профилактическими целями работники хозяйств начинают необоснованно широко и нерационально применять антибиотики, что в конечном итоге приводит к селекции антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов, увеличению затрат на последующие лечебные мероприятия при снижении их эффективности, продолжительному бактерионосительству.

Цель настоящего исследования – изучение этиологической структуры возбудителей инфекционных болезней лососевых рыб

в Северо-Западном регионе, а также уровня антибиотикорезистентности выделенных изолятов.

Материалы и методы

В период с января 2016 года по декабрь 2018 исследованиям подвергнуто 10636 экз. форели радужной, 1104 экз. атлантического лосося, 1699 экз. лососевых рыб других видов (пелядь, чир, муксун, сиг, кумжа) из предприятий Северо-Западного региона; научные исследования выполняли в лаборатории ихтиопатологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН. Отбор проб и бактериологические исследования выполняли по общепринятым методикам, в соответствии со Сборником инструкций по борьбе с болезнями рыб и другими нормативными документами [7, 9]. Для идентификации использованы схемы, изложенные в «Руководстве по определению бактерий» [6] и «Определителе нетривиальных патогенных грамотрицательных бактерий» [2]. Для дифференциации микроорганизмов проводили посевы на селективные и накопительные среды: SKDM и KDM-2 – для *Renibacterium salmoninarum*; Anacker & Ordal,s; FPM – для *Flexibacter columnaris*, *Flexibacter branchiophila*, *Cytophaga psychrophila*; *Furunculosis agar*, бактоагар Дифко, TSA, TSB, SW, МПА с фенилаланином и МПБ – для *Aeromonas salmonicida* (и подвижных видов: *Aeromonas*, *Pseudomonas*), йерсиний и др.видов; среда №10, сывороточный агар, энтерококкагар – стафилококков, стрептококков [1, 8]. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводилась с использованием праймеров, предложенных МЭБ [10] и авторского дизайна [4].

Определение чувствительности к антибактериальным препаратам проводилось диско-диффузионным методом с использованием дисков фирм ООО «НИЦФ» (Россия), «HIMEDIA» (Индия), «OXOID» (Великобритания).

Чувствительность выделенных штаммов грамотрицательных микроорганизмов определяли к офлоксацину, ломефлоксацину, энрофлоксацину, норфлоксацину, ципрофлоксацину, амикацину, цефалексину, цефиксиму, ампициллину, пипероциллину, меропенему, цефепиму,

хлорамфениколу (левомецетину), карбенициллину, канамицину, полимиксину, тетрациклину, фурадонину, гентамицину, тобрамицину, цефазолину, цефалотину, цефтриаксону, эритромицину, фуразолидону, линкомицину.

Чувствительность *Renibacterium salmoninarum* определяли к ванкомицину, гентамицину, линкомицину, рифампицину, ципрофлоксацину, эритромицину, стрептомицину, цефоперазону, цефипиму, имипенему, норсульфазолу, сульфанетоксазолу, сульфадимезину, триметоприму, моксифлоксацину, энрофлоксацину, норфлоксацину.

Этиологическую роль и вирулентность выделенных микроорганизмов определяли в биопробе.

Результаты и обсуждение

В исследуемый период было зарегистрировано 442 обращения для бактериологического исследования гидробионтов разных видов из рыбоводческих хозяйств Северо-Западного региона. Положительные результаты получены в 75 случаях, что составляет 17%, в остальных случаях роста вирулентной бактериальной микрофлоры выявлено не было.

Наиболее часто выявлялись миксобактерии, возбудитель йерсиниоза и псевдомонады (табл. 1).

Из грамотрицательной флоры превалировала *Cytophaga psychrophila*. При этом установлено, что аэромонады, псевдомонады и миксобактерии чаще всего выявляются в виде ассоциаций с разными значениями КОЕ в первичных посевах, патогенность которых при постановке биопробы обычно незначительная, развития клинических признаков не наблюдается. Контаминация внутренних органов рыб слабовирулентными формами бактерий свидетельствует о течении бактериальной геморрагической септицемии (БГС) и общем снижении резистентности организма рыб.

Для *Yersinia ruckeri*, выделенных из внутренних органов, был характерен обильный, переходящий в сливной, рост микроорганизмов, что обычно свидетельствует об острой септицемии. Практически во всех случаях заболевание протекало по типу моноинфекции.

Доля стрептококков, энтерококков, неподвижных аэромонад *Aeromonas salmonicida* – возбудителя фурункулеза лососевых в структуре выделенных в анализируемый период штаммов микроорганизмов крайне незначительна (1–3 случая).

Выявлено 10 случаев выделения грамположительных микроорганизмов вида

Таблица 1

Спектр выделенных микроорганизмов

Вид бактерии	Количество случаев выявления	Вид бактерии	Количество случаев выявления
<i>Cytophaga psychrophila</i> (<i>Flavobacterium psychrophilum</i>)	30	<i>Streptococcus sp.</i>	3
<i>Yersinia ruckeri</i>	28	<i>Flexibacter branchiophila</i> (<i>Flavobacterium branchiophilum</i>)	2
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	18	<i>Enterococcus sp.</i>	2
<i>Flexibacter columnaris</i> (<i>Flavobacterium columnare</i>)	17	<i>Enterobacter sp.</i>	1
<i>Renibacterium salmoninarum</i>	10	<i>Aeromonas salmonicida</i>	1
<i>Aeromonas sobria</i>	9	Морская аквакультура	
<i>Aeromonas caviae</i>	7	<i>Vibrio wodanis</i>	4
<i>Citrobacter freundii</i>	6	<i>Tenacibaculum maritimum</i> (<i>Cytophaga marina</i> ; <i>Flexibacter maritimus</i>)	3
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5	<i>Moritella viscosa</i>	2
<i>Pseudomonas putida</i>	4	<i>Flexibacter branchiophila</i> (<i>Flavobacterium branchiophilum</i>)	2

Renibacterium salmoninarum – возбудителя бактериальной почечной болезни (bacterial kidney disease, BKD). Формирование колоний на плотных средах KDM-2 и SKDM отмечалось на 15 и 21 сутки (соответственно), что свидетельствовало об открытой форме болезни, а в ряде случаев на 45 и 55 сутки как латентное носительство. Следует отметить, что это первое сообщение о выявлении возбудителя BKD в аквакультуре России.

В марикультуре от рыб изолировали микроорганизмы *Tenacibaculum maritimum* (*Cytophaga marina*; *Flexibacter maritimus*), *Vibrio wodanis*, *Moritella viscosa*. Данная микрофлора является условно-патогенной, и её спектр свидетельствует о снижении резистентности организма лососевых рыб в зимний период. Нарушение биотехники выращивания, влияние других стресс-факторов и дальнейшее угнетение иммунитета проводило как к развитию самостоятельных заболеваний, так и к вспышкам ассоциированной инфекции.

В таблице 2 представлена чувствительность к антимикробным препаратам микроорганизмов, наиболее часто выделяемых от рыб. Аэромонады, за исключением

A. salmonicida, псевдомонады вида *P. putida*, а также стрептококки и энтерококки для рыб являются условно-патогенными, поэтому единичные случаи их выявления, в составе микробных ассоциаций, позволили не учитывать их индивидуальные характеристики чувствительности при подборе антибактериальной терапии.

Установлено, что большая часть штаммов сохраняет чувствительность к препаратам цефалоспоринового ряда (цефтриаксон, цефолексин, цефипим), фторхинолонового ряда (энрофлоксацин, норфлоксацин, офлоксацин и т.п.), хлорамфениколу, при этом все штаммы отличались высокой резистентностью к фуразолидону, пиперациллину, канамицину, амикацину, азтреонаму, за исключением нескольких штаммов *Pseudomonas chlororaphis*.

Как видно из таблицы 3, все выделенные штаммы *Renibacterium salmoninarum* были умеренно- и высокочувствительны к синтетическим производным амида сульфаниловой кислоты, карбапенемам, эритромицину, хорошую активность показал синтетический бактериостатик, производный диаминопиримидина – триметоприм. Высокий уровень

Таблица 2

Наибольшая чувствительность к антибактериальным препаратам грамотрицательных бактерий, выделенных от рыб (по видам)

Наименование антибиотика	<i>Cytophaga psychrophila</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Flexibacter columnaris</i>
Офлоксацин (ОФ)	+	+	+	±
Энрофлоксацин (ЭФ)	+	+	+	±
Цефалексин (ЦФЛ)	+	±	±	+
Норфлоксацин (НОР)	±	±	±	±
Ципрофлоксацин (ЦИП)	±	+	±	±
Ломефлоксацин (ЛОМ)	+	+	+	+
Ампициллин (АМП)	-	-	±	±
Цефипим (ЦПМ)	±	±	+	+
Хлорамфеникол (С)	±	±	±	+
Тетрациклин (ТЕТ)	±	±	±	-
Налидиксовая кислота (НК)	-	-	±	±
Цефазолин (ЦЗ)	+	±	+	±
Цефтриаксон (ЦРО)	+	+	±	±
Фуразолидон (ФРН)	-	-	±	-

Примечание: Чувствителен – «+»; промежуточная чувствительность – «±»; резистентность – «-».

Чувствительность *Renibacterium salmoninarum* к антибактериальным препаратам

Наименование антибиотика	Чувствительность	Наименование антибиотика	Чувствительность
Рифампицин	±	Норсульфазол	+
Цефоперазон	±	Сульфаметоксазол	±
Цефипим	±	Сульфадимезин	±
Имипенем	+	Триметоприм	+
Моксифлоксацин	±	Эритромицин	+

резистентности установлен для гентамицина, ванкомицина, стрептомицина, препаратов тетрациклинового и фторхинолонового рядов I поколения, пенициллиновой группы.

В марикультуре серьезную опасность представляет выявление из внутренних органов (почек) рыб и жаберного аппарата микроорганизмов *Flexibacter branchiophila* (*Flavobacterium branchiophilum*) с сопутствующей кокковой микрофлорой. Инфицирование жабр свидетельствует о развитии бактериальной жаберной болезни (BGD), при котором за короткое время происходит массовая гибель рыбы без видимой патологии. Со временем инфекционный процесс переходит в хроническую стадию, что сопровождается высокой смертностью рыб с проявлением клинических признаков болезни: отказ от корма, дезориентация в пространстве (рыба принимает вертикальное положение, хаотичное плавание), отсутствие реакций на внешние раздражители, увеличение числа дыхательных движений, открытые жаберные крышки. Пораженная и ослабленная бактериальной жаберной болезнью рыба восприимчива к заражению условно-патогенными микроорганизмами бактериальной и/или грибной природы. Для лечения миксобактериоза (флавобактериоза, BGD) можно применять лекарственные средства, однако в условиях морских рыбоводных комплексов это физически невозможно. Поэтому борьба с болезнью и предотвращение дальнейшего распространения возбудителя заключается в соблюдении ветеринарно-санитарных правил: своевременный сбор и утилизация трупов и рыб с клиническими признаками заболевания, регулярная очистка делей от остатков корма, продуктов жизнедеятельности.

Заключение

При отсутствии симптомов бактериальных заболеваний самостоятельное назначение и применение антимикробных препаратов является нерациональным и неэффективным, так как доля истинных вирулентных возбудителей болезней в активно развивающейся аквакультуре Северо-Запада пока невелика – 17%. Большое влияние на формирование экономических потерь в отрасли в настоящее время оказывают неблагоприятные экологические условия, несоблюдение условий содержания, плотностей посадки, кормовые токсикозы и т. п. Бесконтрольное применение препаратов в условиях неподтвержденного диагноза и определенной антибиотикограммы способствует формированию антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов, что ограничивает в дальнейшем выбор медикаментозных средств борьбы, формирует очаг бактерионосительства и, в целом, негативно влияет на окружающую среду, организм рыб и потребительские качества продукции.

Знание этиологической структуры инфекционной болезни и резистентности выявляемой микробной ассоциации на предприятии является основой для выработки стратегии антибактериальной терапии. Применение препаратов должно быть основано на результатах микробиологического исследования. В случае массовой гибели рыб с объективными подозрениями на бактериальное заболевание (язвенные поражения на теле, экзофтальмия и т. п.), вызываемое грамотрицательной микрофлорой, для незамедлительного назначения необходимо использовать препараты цефалоспоринового ряда (цефтриаксон, цефолексин, цефипим), фторхинолонового ряда (энрофлоксацин, норфлоксацин) или хлорамфеникол. При этом антибиотикотерапия не гарантирует 100%

ликвидации заболевания йерсиниозом, миксобактериозом и некоторыми другими, а также отсутствия повторных вспышек, вследствие высокой устойчивости возбудителей во внешней среде, особенно при наличии большого количества органических веществ (донные иловые отложения, слабопроточная, застойная вода, загрязненные дели и т.п.) что неизбежно при интенсивном производстве.

Гораздо целесообразней мировая практика борьбы с бактериозами рыб, которая заключается в поголовной вакцинопрофилактике и соблюдении ветеринарно-санитарных правил при выращивании. В России также ведется разработка и внедрение вакцинных препаратов из эндемичных штаммов бактерий, так как авторам важно, чтобы профилактика способствовала устойчивому биологическому производству продукции при незначительном, строго обоснованном потреблении антибиотиков [3, 5].

Список литературы

1. Анттила П. Диагностика бактериальных болезней рыб (лабораторное пособие на основе практики финских специалистов) / Анттила П. НИИ Охотничьего и рыбного хозяйства Финляндии, 2011. 43 с.

2. Вейант Р. Определитель нетривиальных патогенных грамотрицательных бактерий / Вейант Р., Мосс У., Уивер Р., Холлис Д., Джордан Дж., Кук Э., Дейншвар М. М.: «Мир», 1999.

3. Дрошнев А. Е. Разработка новых и совершенствование применяемых методов профилактики вибриоза лососевых рыб / А. Е. Дрошнев, Е. А. Завьялова, О. В. Хлунов // Аграрная наука и образование в условиях становления инновационной экономики материалы международной научно-практической конференции. Оренбург, 2012. С. 341.

4. Завьялова Е. А. Использование метода ПЦР для дифференциальной диагностики йерсиниоза лососевых рыб / Е. А. Завьялова, П. Д. Богданова, Д. М. Щепетов, А. Е. Дрошнев, М. И. Гулюкин // Молекулярная диагностика. М., 2014. С. 476.

5. Завьялова Е. А. Изучение биологических свойств *Yersinia tuckeri* и разработка противойерсиниозной вакцины для лососевых рыб / Е. А. Завьялова, А. Е. Дрошнев, П. Д. Богданова, М. И. Гулюкин // Ветеринария и кормление. 2017. № 1. С. 28–30.

6. Руководство по определению бактерий / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса, 9-е издание в 2 т. М.: «Мир», 1997.

7. Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб в 2 томах. М.: АМБ-агро, 1998.

8. Скородумов Д. И. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных (справочник) / Д. И. Скородумов, В. В. Субботин, М. А. Сидоров, Т. С. Кристенко. М., 2005.

9. Buller N. B. Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual, 2004.

10. Diagnostic manual for Aquatic animal diseases, O.I.E., 5th edition, 2006. P. 210–227.

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 2019 г. согласно инф. письму б/н от 03.09.18 г. НДС не облагается. Адрес подписки: ...»

Стоимость редакционной подписки на 2019 год:

2000 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

DOI: 10.24411/2074-5036-2019-10039

УДК 597.442-146.511:597-12

Ключевые слова: фиолетовый К, эксперимент, лекарственные средства, ветеринарные препараты, аналог
 Keywords: purple K, experiment, medical drugs, veterinary drugs, analogue

Володина В. В., Баринаова В. В., Менькова А. В., Сакетова К. Ш., Гнучева В. И., Яковлева Е. П., Лушникова А. А.

**ПОИСК ЭФФЕКТИВНЫХ СРЕДСТВ ПРОТИВ САПРОЛЕГНИОЗА ИКРЫ
 ОСЕТРОВЫХ РЫБ**

THE SEARCH OF EFFECTIVE AGENTS AGAINST SAPROLEGNIOSIS OF STURGEON EGGS

ФГБНУ «Каспийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства», г. Астрахань

Адрес: 414056, Россия, Астрахань, ул. Савушкина, 1

FSBSI Caspian Fisheries Research Institute, Astrakhan

Address: 414056, Russia, Astrakhan, Savushkina Str., 1

Володина Виктория Викторовна, к. б. н., заведующий лабораторией ихтиопатологии. E-mail: kaspnirh@mail.ru
Vicktoria Viktorovna Volodina, PhD of Biology Sciences, Head of the Laboratory of Ichthyopathology.

E-mail: kaspnirh@mail.ru

Баринаова Виктория Владимировна, и. о. заместителя начальника НЭБ «БИОС» по научной работе.

E-mail: kaspnirh@mail.ru

Vicktoria Vladimirovna Barinova, acting Deputy head of NEB "BIOS" for scientific work. E-mail: kaspnirh@mail.ru

Менькова Анна Витальевна, научный сотрудник лаборатории ихтиопатологии. E-mail: kaspnirh@mail.ru

Anna Vital'evna Men'kova, researcher of the Laboratory of Ichthyopathology. E-mail: kaspnirh@mail.ru

Сакетова Кавива Шарипуловна, главный специалист НЭБ «БИОС». E-mail: kaspnirh@mail.ru

Kaviva Sharipulovna Saketova, senior specialist of NEB "BIOS". E-mail: kaspnirh@mail.ru

Гнучева Вера Игоревна, начальник бассейнового цеха НЭБ «БИОС». E-mail: kaspnirh@mail.ru

Vera Igorevna Gnucheva, the head of the basin workshop NEB "BIOS". E-mail: kaspnirh@mail.ru

Яковлева Екатерина Павловна, начальник цеха по работе с производителями НЭБ «БИОС».

E-mail: kaspnirh@mail.ru

Ekaterina Pavlovna Yakovleva, workshop supervisor for cooperation with manufacturers NEB "BIOS"

E-mail: kaspnirh@mail.ru

Лушникова Анастасия Алексеевна, ведущий рыбовод НЭБ «БИОС». E-mail: kaspnirh@mail.ru

Anastasia Alekseevna Lushnikova, senior fish breeder NEB "BIOS". E-mail: kaspnirh@mail.ru

Аннотация. Приведены материалы экспериментальной работы по поиску аналога органического красителя «фиолетовый К», ранее применяемого в рыбоводстве. Первый этап эксперимента включал в себя отработку методики выделения и культивирования «гросс-культуры» микромицетов *p. Saprolegnia* на различных приманках. На втором этапе эксперимента отработывалась методика заражения оплодотворенной икры осетровых рыб паразитическими организмами *p. Saprolegnia*. Третий этап эксперимента включал в себя апробирование химических веществ в производственных условиях. Для борьбы с сапролегниозом икры осетровых рыб были использованы следующие препараты: формалин, перекись водорода, «Монклавит-1». Выявлено, что применение формалина в качестве препарата для борьбы с сапролегнией в период инкубации икры осетровых видов рыб нецелесообразно, так как данное вещество даже в низких концентрациях обладает сильным токсическим эффектом. После обработки икры препаратом «Монклавит-1» патологий у эмбрионов не выявлено, однако данное средство оказалось малоэффективным, так как оказало негативное влияние на микромицеты *p. Saprolegnia* только при использовании самой высокой концентрации – 3 %. Обработка икры 3%-ным раствором препарата «Монклавит-1» приводила к уплотнению оболочек икры. Использование перекиси водорода перспективно, однако необходимы дополнительные исследования по поиску растворов с оптимальными концентрациями, а также разработки нового метода внесения препарата.

Summary. The article presents the materials of experimental work on searching of the organic coloring agent "purple K" analogue, previously used in fish farming. The first stage of the experiment included the development of methods of differentiation and cultivation of "gross culture" micromycetes *R. Saprolegnia* on various baits. At the second stage of the experiment the method of infecting fertilized sturgeon eggs with *Saprolegnia* parasitic organisms was worked out. The third stage of the experiment included testing of chemicals in production conditions. In order to cure saprolegnios of sturgeon fish eggs the following agents were used: formalin, hydrogen peroxide, "Monklavit-1". It was identified that the use of formalin as the drug to cure saprolegnia during the incubation of sturgeon species is impractical, since this substance has a strong

toxic effect even in low concentrations. After treatment of eggs with the drug "Monklavit-1" pathologies in embryos were not revealed, but this agent was not effective, as it had a negative impact on the micromycetes of R. Saprolegnia only with the highest concentration – 3 %. Treatment of eggs with 3% solution of the drug "Monklavit-1" led to compaction of the egg shells. The usage of hydrogen peroxide is potentially productive, but additional research is necessary in order to find solutions with optimal concentrations, as well as the development of a new method of introducing the drug.

Введение

Благополучие объектов аквакультуры по инвазионным и инфекционным заболеваниям – важнейшее условие, необходимое для нормального функционирования и рентабельности рыбоводного хозяйства. Повышение интенсификации рыбоводного процесса, как правило, приводит к ухудшению экологической и эпизоотической ситуации, а зачастую и к возникновению эпизоотий, что наносит прямой экономический ущерб от потерь, связанных как с гибелью рыб, так и с недополучением рыбного сырья высокого качества. В связи с этим для поддержания эпизоотического благополучия рыбоводных хозяйств необходимо не только регулярно проводить профилактические рыбоводно-мелиоративные мероприятия, но и иметь достаточное количество и широкий ассортимент лекарственных средств.

Основой государственного контроля качества и безопасности выпускаемых лекарственных препаратов в области ветеринарии служит лицензирование фармацевтической деятельности, осуществляемой согласно ФЗ «О лицензировании отдельных видов деятельности» от 04.05.2011 г. № 99–ФЗ, с изменениями и дополнениями от 03.08.2018 г. [16]; приказа Россельхознадзора от 19.04.2012 г. № 191 «О лицензировании фармацевтической деятельности», с изменениями и дополнениями от 18.05.2012 г. [10].

Следует отметить, что применение незарегистрированных препаратов допускается только при проведении их производственных испытаний, при этом препарат должен пройти полный цикл доклинических исследований (определение токсичности для рыб и теплокровных животных, сроков выведения вещества из рыбы, влияние его на воспроизводительную функцию, потомство и т. д.).

Для профилактики инфекционных заболеваний рыб на рыбоводных хозяйствах в соответствии с документом «Рекомендации по организации противопаразитарных обрабо-

ток в рыбоводстве» [12], утвержденным Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода РФ 07.10.1999 г., эффективно использовали органический краситель «фиолетовый К», однако при вступлении в силу с 1 сентября 2017 года стандартов на рыбную продукцию в соответствии с требованиями технического регламента Евразийского экономического союза «О безопасности рыбы и рыбной продукции» (ТР ЕАЭС 040/2016) [15] применение данного химиотерапевтического средства запрещено. Запрет на использование красителей в аквакультуре обусловлен опасностью для здоровья человека от употребления рыбы, содержащий в себе данное средство: ряд исследований показал наличие у веществ явных канцерогенных и тератогенных свойств [11].

В связи с этим целью исследований является поиск эффективных противомикозных средств, допустимых к применению в аквакультуре.

Микозы у рыб и икры инициируют плесневые микромицеты порядка сапролегниевые (*Saprolegniales*), относящиеся к нескольким родам: *Achlya*, *Aphonomyces*, *Dictyuchus*, *Leptolegnia*, *Saprolegnia* и др. [4]. По классификации Г. Ц. Айнсворта сапролегниевые грибы принадлежат к царству грибов, отделу *Eumycota*, классу *Oomycetes*, порядку *Saprolegniales*, семейству *Saprolegniaceae*. Наиболее распространенными и патогенными являются следующие виды: *Ach. flagellate*, *Ach. laevis*, *D. monosporus*, *S. ferax*, *S. mixta*, *S. parasitica* [5]. Температурный оптимум для вышеуказанных видов микроорганизмов составляет 15–20°C, как и для развития оплодотворенной икры осетровых рыб. Кроме того, при интенсивном выращивании рыб в системах замкнутого водоснабжения, в отличие от прямооточных систем, возрастает риск распространения инфекционного агента и повышения уровня зараженности рыб. Сапролегнией, как правило, поражается неоплодотворенная, травмированная, физио-

логически неполноценная икра при инкубировании. При контакте с мертвой икрой, пораженной микромицетами, возможно заражение и живых развивающихся икринок. Потери от этого заболевания могут достигать 90 % [5, 6]. Негативное влияние представителей *pp. Saprolegniales* и *Achlya* выражено в разрыхлении поверхности оболочек икры с последующей их деструкцией и вакуолизацией, в ряде случаев гифы прорастают внутрь икринок.

Материалы и методы

Материалом для исследований послужила оплодотворенная икра стерляди (*Acipenser ruthenus*), пробы воды и налета с поверхности тела карповых рыб, зараженных сапролегнией, и пораженная микромицетами икра осетровых видов рыб (севрюги) в период инкубации. Эксперимент по искусственному воспроизведению сапролегниоза на икре осетровых рыб и апробации веществ в борьбе с микозной инфекцией проводили с февраля по июнь 2018 г. Обработку икры дезинфицирующими средствами проводили методом кратковременных лечебных ванн [2, 11] на 16-й и 21-й стадиях развития [5]. Для оценки воздействия дезинфицирующих средств на развитие эмбрионов определяли стандартные рыбоводно-биологические показатели: процент оплодотворения, развития, выклева предличинок [13], а также процент заражения микромицетами *p. Saprolegnia*, процент патологий [1]. Показатели определяли с использованием микроскопа Биомед МС-1 Стерео. [4, 6, 7, 17]. При выделении и культивировании микромицетов, изолированных из пораженной икры, воды, использовали методы, применяемые для изучения водных оомицетов по Цейпу. Всего было собрано 330 проб и проведено 3630 анализов.

Работа с патогенными микроорганизмами проводилась в стерильных условиях на базе лаборатории ихтиопатологии ФГБНУ «КаспНИРХ», имеющей лицензию на деятельность, связанную с паразитическими организмами, относящимися к III и IV группам патогенности. Производственную часть эксперимента осуществляли на базе НЭБ «Биос» ФГБНУ «КаспНИРХ». При планировании экспери-

мента были учтены обработки инкубационных аппаратов, рыбоводного инвентаря хлорамином Б (20 г/м³ в течение 24 часов), регулярные заправки дезинфицирующих ковриков раствором «Forbicide» (0,5 %-ный раствор), а также соблюдение общих правил санитарии в инкубационном цехе.

Первый этап эксперимента включал в себя отработку методики выделения и культивирования «гросс-культуры» грибов *p. Saprolegnia* на различных приманках. Для этого были отобраны пробы воды и ватобразного налета с поверхности тела карповых рыб, а также зараженная икра севрюги в период их инкубации на НЭБ «БИОС». В лабораторных условиях культивировали микромицеты с помощью «приманок» (проваренное льняное семя, личинки гаммаруса и вареный куриный белок) до образования зооспорангий и гемм. В дальнейшем эксперимент проводили с использованием культур, выделенных на вареном курином белке. «Приманку» с мицелием грибов промывали в стерильной водопроводной воде и помещали в стерильные чашки Петри с такой же водой. Инкубацию проводили при температуре 19–20°C. По мере роста мицелия проводили микроскопию для определения «чистоты» культуры и наличия органов размножения.

Помимо механического способа очистки культур от бактериального загрязнения применяли химические – в воду, содержащую мицелий грибов, добавляли растворы молочной и борной кислоты, задавая pH = 7–8.

На втором этапе эксперимента в лабораторных условиях в стерильные чашки Петри с оплодотворенной икрой (по 15 г) вносили стерильную водопроводную воду и «приманку», содержащую культуру грибов на стадии образования зооспор. В контрольные емкости вносили только икру. Опыты проведены при температуре воды 19–20°C, pH = 7–8, что максимально приближено к условиям инкубации на осетровых заводах.

Следующий этап эксперимента включал в себя апробирование химических веществ в производственных условиях. С этой целью для испытания были выбраны формалин, перекись водорода и «Монклавит-1», как средства, обладающие противомикробным, про-

тивовирусным и фунгицидным действием. В рыбоводной практике для предупреждения заражения сапролегниевыми грибами икру перед закладкой на инкубацию обрабатывают 0,5 % раствором формалина (экспозиция – 3 мин). Ввиду того что формальдегид – токсичное вещество и под его воздействием происходит денатурация белка с образованием новых соединений, было решено использовать предельно низкие концентрации (табл. 1). Ветеринарный йодосодержащий препарат «Монклавит-1» был успешно апробирован на инкубируемой икре радужной форели [4], однако на данный момент отсутствует информация о его эффективности в борьбе с сапролегниозом у осетровых рыб. Перекись водорода разрушает токсины и уничтожает инфекционные агенты, является сильным окислителем и, согласно литературным источникам, может применяться в рыбоводстве [11]. Однако сведения о дозировках и схемах введения вещества отсутствуют.

Для эксперимента 07.06.2018 г. была получена икра (рис. 3а) от двух самок стерляди весом 3,6 кг и 2,8 кг и оплодотворена спермой от четырех самцов весом $1,8 \pm 0,05$ кг. Оплодотворенную икру обесклеивали танином (0,7 г/л, экспозиция – 1 мин 40 сек) и закладывали в инкубационные аппараты типа «Осетр» (по 50 г на лоток) (рис 3б). В эксперименте было задействовано 13 вкладышей (12 вкладышей на обработку испытуемыми

растворами разных концентраций и 1 вкладыш – контроль). Стойка, задействованная в эксперименте, находилась в условиях прямого тока. Ежедневно проводился гидрохимический анализ воды [3].

В период инкубации провели экспериментальную обработку икры стерляди в ваннах с заданными концентрациями растворов формалина, перекиси водорода и препарата «Монклавит-1» (дважды – на 16 и 21 стадии развития икры), выдерживая икру в течение времени соответственно концентрациям растворов (Таблица 1). Перед обработкой испытуемыми веществами икру на 3–5 мин погружали в физиологический раствор в соответствии с технологией, принятой при работе с йодсодержащими препаратами в Финляндии [14]. Для выявления патоморфологических изменений развивающихся эмбрионов перед ваннами и спустя час после них проводили микроскопию из опыта и контроля.

Параллельно был проведен эксперимент по заражению оплодотворенной икры стерляди в чашках Петри в лабораторных условиях. В качестве «приманок» использовали вареное куриное яйцо и икру севрюги, пораженную микромицетами *p. Saprolegnia*, предварительно промыв двукратно в стерильной водопроводной воде. Процесс заражения проходил при температуре воды 19–21°C, pH = 8–9.

Таблица 1

Дозировки испытуемых веществ при экспериментальной обработке оплодотворенной икры стерляди

Наименование	Экспозиция, мин.	Концентрация раствора, %
Формалин	3	0,0020
	10	0,0010
	15	0,0006
Перекись водорода	5	0,0500
	10	0,0300
	15	0,0100
«Монклавит-1»	10	3,0000
		2,5000
		2,0000
	15	1,5000
		1,0000
		0,5000

В течение всего периода инкубации осуществляли контроль и фотофиксацию эмбрионального развития стерляди и определения процента развития икры после обработки, для этого в чашку Петри отбирали 200 икринок из каждого лотка и считали количество развивающихся и количество остановившихся в развитии.

Результаты исследований и обсуждение

При выполнении первого этапа эксперимента (выделение сапролегниевых микромицетов) активный рост грибов *p. Saprolegnia* отмечен на вареном курином белке, на семенах льна и личинках гаммаруса зарастание происходило слабо (рис. 1). Из двух выбранных кислот эффективной в борьбе с бактериальным загрязнением была борная кислота.

В результате исследований из воды и из пораженной икры севрюги выделены гросскультуры грибов *p. Saprolegnia*.

Второй этап эксперимента заключался в отработке методики заражения оплодотворенной икры осетровых рыб паразитическими грибами *p. Saprolegnia*. Для этой стадии опыта было проведено получение икры от двух самок стерляди, процент оплодотворения икры составил 90 % (согласно приказа № 377 Министерства сельского хозяйства РФ от 25.08.2015 г. средний процент оплодотворения – 60 %). Плодовитость соответствовала 84 шт./г (вес икры – 11,9 мг)

Результаты показали, что заражение икры водными паразитическими грибами наступало через 12 часов (на 13–14 стадиях развития икры) (рис. 2). Через 30 часов после заражения на 20–21 стадии развития количество зараженной икры составило 5 %.

Третий этап эксперимента проводили в производственных условиях. Известно, что на развитие сапролегниоза влияет также качество икры, которое в первую очередь, связано с физиологическим состоянием производителей. Плодовитость в среднем соответствовала 68 икринок на грамм, процент оплодотворения – 85 %. Полученные показатели соответствовали норме [9] и являлись косвенным доказательством удовлетворительного состояния производителей стерляди в период нерестовой кампании.

Параллельно с производственным экспериментом проводили лабораторный по заражению икры сапролегниевыми микромицетами. Визуально начало заражения регистрировали через 11–13 часов после закладки икры (рис. 4). Патологии в пораженной сапролегниозом икре выражались в рыхлости верхней студенистой оболочки, разрушении желточных оболочек, сглаживании границ между ними, прорастании гифов внутрь оболочек. Через 35 часов от начала эксперимента процент поражения опытной икры составлял 7,3 % от общего числа, в результате микроскопирования зараженной икры было выявлено, что она остановилась в развитии. Спустя 7 часов уровень поражения достиг максимума, составив 10,6 % от общего числа икры.

Обработку оплодотворенной икры стерляди с зараженными «приманками» в чашках Петри проводили на 16 и 22 стадии по тем же схемам, как и обработку в аппарате. Результаты эксперимента показали, что микромицеты продолжали развиваться после обработок растворами как перекиси водорода, «Монклавита-1», так и формалина, что указывает на низкую фунгицидную способность испытуемых веществ указанных концентраций.

Оплодотворенная икра, задействованная в эксперименте, при инкубации находилась в условиях прямотока. Гидрохимические показатели воды, приведенные в таблице 2, соответствовали нормативным [8], а также свидетельствовали об оптимальных условиях ($t = 12,0\text{--}20,0^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 7,0\text{--}8,3$; $\text{O}_2 = 8,0\text{--}14,5$ мг/л) для развития микромицетов *p. Saprolegnia* [6].

По результатам третьего этапа – производственного эксперимента, следует отметить, что среди выбранных концентраций раствора перекиси водорода при использовании 0,03 % выявлено наименьшее количество икры, пораженной микромицетами, но, вместе с тем, имели место случаи развития повреждений в оболочках икры и остановки в их развитии (табл. 3).

Единственный эффективный 3%-ный раствор препарата «Монклавит-1», при использовании которого не регистрировался рост микромицетов, оказывал негативное влияние на оболочки икры, уплотняя их, что влияло на

Таблица 2

Гидрохимические показатели воды при инкубировании икры стерляди в эксперименте

Дата	t°C	pH	O ₂ мг/л	NH ₄	NO ₂	NO ₃
07.06.2018	18,4	7,6	6,4	0,66	0,12	4,7
08.06.2018	18,5	7,7	5,4	0,66	0,10	6,6
09.06.2018	18,9	7,6	6,7	0,56	0,09	6,4
13.06.2018	19,6	7,6	6,0	0,65	0,15	8,6
14.06.2018	19,7	7,8	7,8	0,43	0,14	5,5
15.06.2018	20,0	7,8	8,0	0,43	0,10	3,8
17.06.2018	20,4	7,9	8,0	0,16	0,07	3,7

выклев личинки. Так, при его использовании отмечено наименьшее количество выклюнувшейся личинки (1,8 %). Однако, именно эта концентрация препятствовала заражению здоровой икры от «приманки», и после двукратной обработки раствором этой концентрации процент зараженной икры микромицетами был наименьший (11 %) (табл. 4).

После обработки икры 0,002 % раствором формалина отмечен минимальный уровень микозного заражения, но максимальный показатель отхода (табл. 5). При этом количество развивающейся икры на стадии 23–24 в лотке с контрольной группой составил 76,9 %.

После первичной обработки (16 стадия) 1%-ным, 1,5%-ным и 2,5%-ным растворами препарата «Монклавит-1» зафиксировано увеличение случаев остановки эмбрионального развития (18 стадия) по сравнению с контрольной группой в среднем на 1,6 %.

При обработке икры остальными растворами препаратов процент остановившейся в развитии икры был меньше, чем в контрольной группе. После обработки растворами перекиси водорода и формалина (18–19 стадии) приблизительно у 5,3 % остановившейся в эмбриональном развитии икры отмечено нарушение структуры оболочки. Увеличение процента остановившейся в развитии икры наблюдалось после второй обработки на 22 стадии развития, особенно при обработке 0,002 % раствором формалина (9,3 %), 1,0 %, 3,0 % раствора «Монклавита-1» (21,4 %, 13,4 % соответственно), увеличение процента остановившейся в развитии икры при обработке перекисью водорода было практически одинаковым для всех концентраций раствора (12,4–12,8 %). В контрольной группе, не подвергавшейся обработке, отмечено небольшое увеличение, от 18 к 23–24 стадии, «вставшей» икры, всего на 2,7 % (рис. 5). Со-

Таблица 3

Показатели выживаемости оплодотворенной икры в период инкубации после экспериментальной обработки растворами перекиси водорода

Концентрация вещества, %	Стадия развития икры	Количество икры, остановившейся в эмбриональном развитии, %	Количество развивающейся икры, %	Количество пораженной икры, % от общего количества в лотке
0,01	18	13	87	18
	23-24	25,8	74,2	30
0,03	18	15	85	3
	23–24	27,4	72,6	7
0,05	18	15	85	14
	23–24	27,3	72,7	30
Контрольная группа	18	20,7	79,3	11
	23–24	23,1	76,9	19

Таблица 4

Показатели выживаемости оплодотворенной икры в период инкубации после экспериментальной обработки препаратом «Монклавит-1»

Концентрация вещества, %	Стадия развития икры	Количество икры, остановившейся в эмбриональном развитии, %	Количество развивающейся икры, %	Количество пораженной икры, % от общего количества в лотке
0,5	18	14,8	85,2	28
	23–24	16,9	83,1	25
1	18	23,5	76,5	34
	23–24	44,9	55,1	48
1,5	18	21,5	78,5	37
	23–24	22,2	77,8	39
2	18	19,9	80,1	33
	23–24	20,8	79,2	29
2,5	18	21,8	78,2	36
	23–24	23,5	76,5	31
3	18	14,8	85,2	10
	23–24	28,2	71,8	11
Контрольная группа	18	20,7	79,3	11
	23–24	23,1	76,9	19

гласно приказа № 377 Министерства сельского хозяйства РФ от 25.08.2015 г. процент выживаемости икры стерляди при инкубации равен 50 %.

Наибольший уровень патологий зарегистрирован на 23–24 стадии при использовании 0,002 % формалина и 0,03 % и 0,05 % перекиси водорода (рис. 6). Кроме уплотнения оболочки, патологических изменений в икре при обработке ее раствором «Монклавита-1» не зафиксировано.

В целом поражение микозной инфекцией икры осетровых рыб после двукратной обработки растворами разной концентрации (0,002%-ным формалином, 0,03%-ной перекисью водорода и 3,0 %-ным раствором препарата «Монклавит-1») снижалось на 12,0 %, 8,0 % и 9,0 % соответственно по сравнению с контрольной группой. Остальные концентрации испытуемых веществ показали себя малоэффективными в борьбе с сапролегниевыми грибами. Результаты эксперимента

Таблица 5

Показатели выживаемости оплодотворенной икры в период инкубации после экспериментальной обработки растворами формалина

Концентрация вещества, %	Стадия развития икры	Количество икры, остановившейся в эмбриональном развитии, %	Количество развивающейся икры, %	Количество пораженной икры, % от общего количества в лотке
0,002	18	20,1	79,9	5
	23-24	29,4	70,6	10
0,001	18	13,2	86,8	9
	23-24	20,8	79,2	30
0,0006	18	11,3	88,7	11
	23-24	20,2	79,8	40
Контрольная группа	18	20,7	79,3	11
	23-24	23,1	76,9	19

Показатели выклева личинок стерляди при экспериментальной обработке икры растворами разной концентрации

Наименование	Концентрация раствора, %	Выклев личинки, %
Формалин	0,0020	10,0
	0,0010	9,8
	0,0006	16,0
Перекись водорода	0,0500	3,4
	0,0300	34,8
	0,0100	40,7
«Монклавит-1»	0,5	13,8
	1	13,3
	1,5	17,3
	2	4,8
	2,5	3,5
	3	1,8
Контрольная группа	0	87

свидетельствуют о том, что высокие концентрации апробируемых веществ являются эффективными в борьбе с микромицетами, но при этом отмечается негативное влияние таких концентраций на икру.

Минимальный показатель выклева отмечен при использовании 3,0 %-ного раствора «Монклавита-1» (1,8 %). Максимальный выклев регистрировался при обработке икры 0,01%-ным раствором перекиси водорода (40,7 %) (табл. 6). В контроле процент выклева личинки составил 87,0 %.

Личинка при переводе из опытных лотков аппарата «Осетр» в пластиковые бассейны хорошо адаптировалась, сразу распределилась в толще воды, хорошо реагировала на тактильный и шумовой раздражители. При клиническом осмотре полученной личинки были выявлены следующие патологии:

- вздутие брюшка (у 2 % личинок, полученной от икры, обработанной 0,002 % раствором формалина);
- кровоизлияния в головном отделе (у 1 % личинок, полученной от икры, обработанной 0,05 % раствором перекиси водорода).

Таким образом, все концентрации раствора формалина способствовали уплотнению оболочки икры, что в дальнейшем препятствовало выходу личинок из оболочки. Через 6 дней наблюдали 100 % гибель личинки, выключившейся от икры, обработанной формалином.

При использовании всех концентраций (Таб. 6) препарата «Монклавит-1» патологий у личинок не выявлено.

На фоне высокого процента выклева в контрольной группе выклев после обработки икры растворами испытуемых препаратов выглядит неубедительным, и может сложиться впечатление, что обработка икры от микозной инфекции является нецелесообразной. Следует отметить, что инкубация икры проходила в системе с прямоточным водоснабжением. Данные условия, в сравнении с условиями замкнутого водоснабжения, препятствуют циркуляции микозной инфекции в системе. Обработка икры препаратами ведет к увеличению числа мертвой икры, которая является основным объектом заражения для грибов *p. Saprolegnia*, а в контрольной группе это дополнительное условие отсутствовало. Нерестовая кампания на многих рыбных заводах начинается ранней весной, когда температура воды в реке составляет 5–6°C, поэтому процесс инкубации проводят в системах замкнутого водоснабжения с постоянной 16–18°C температурой, оптимальной для развития грибов *p. Saprolegnia*, что будет способствовать увеличению процента заражения икры микозной инфекцией.

Результаты эксперимента показали, что использование раствора формалина в любых концентрациях нецелесообразно, так

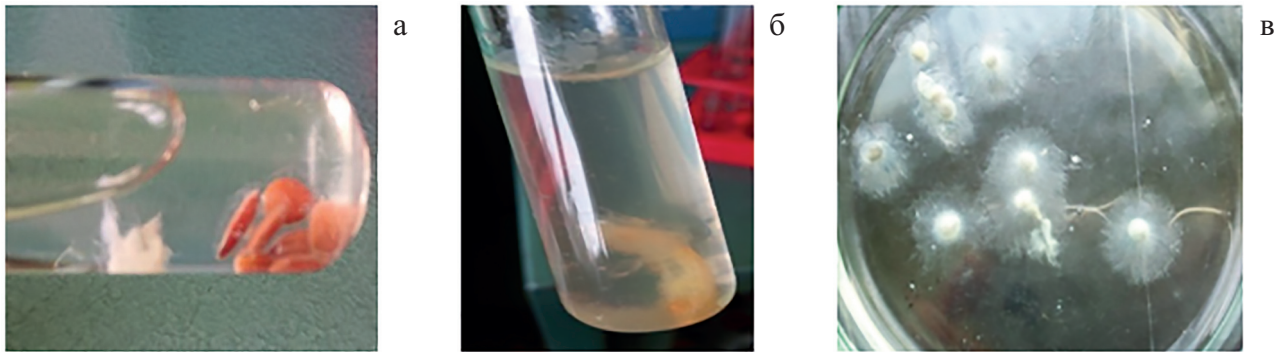


Рис. 1 Первый этап эксперимента. Виды «приманок»: проваренное льняное семя (рост грибов не отмечен) (а); личинка гаммаруса (рост грибов незначительный) (б); вареный куриный белок (отмечен активный рост грибов) (в)

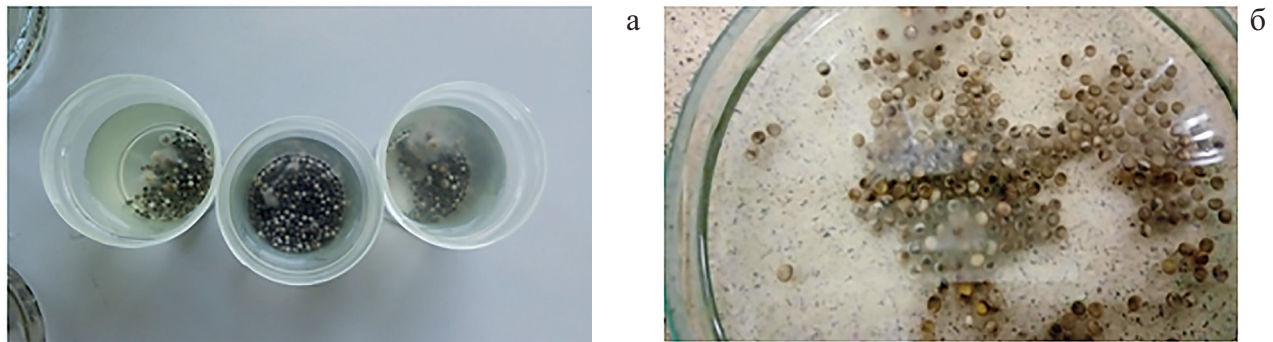


Рис. 2 Первый этап эксперимента: заражение оплодотворенной икры стерляди микромицетами *p.Saprolegnia* («приманкой») служит зараженная икра белуги): икра стерляди через 12 часов после заражения (а); икра стерляди через 14 часов после заражения (б)

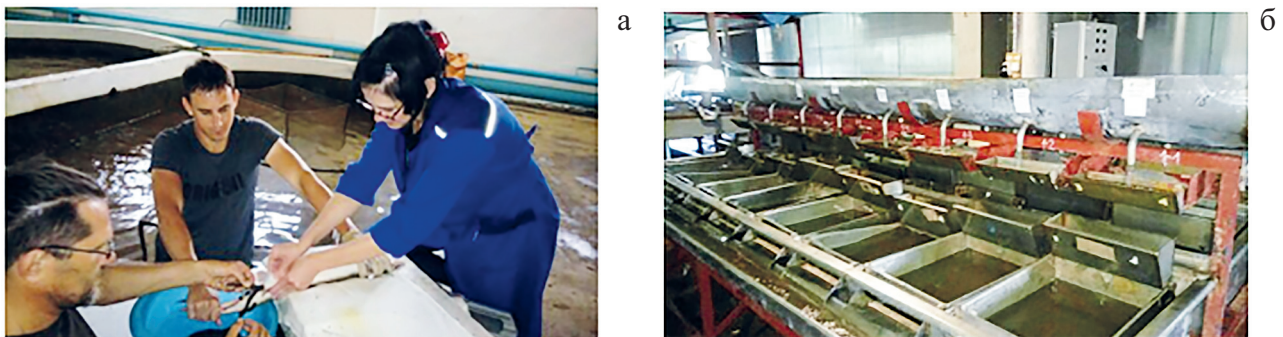


Рис. 3. Второй этап эксперимента: получение икры от стерляди (а); инкубация оплодотворенной икры в инкубационных аппаратах типа «Осетр» (б)

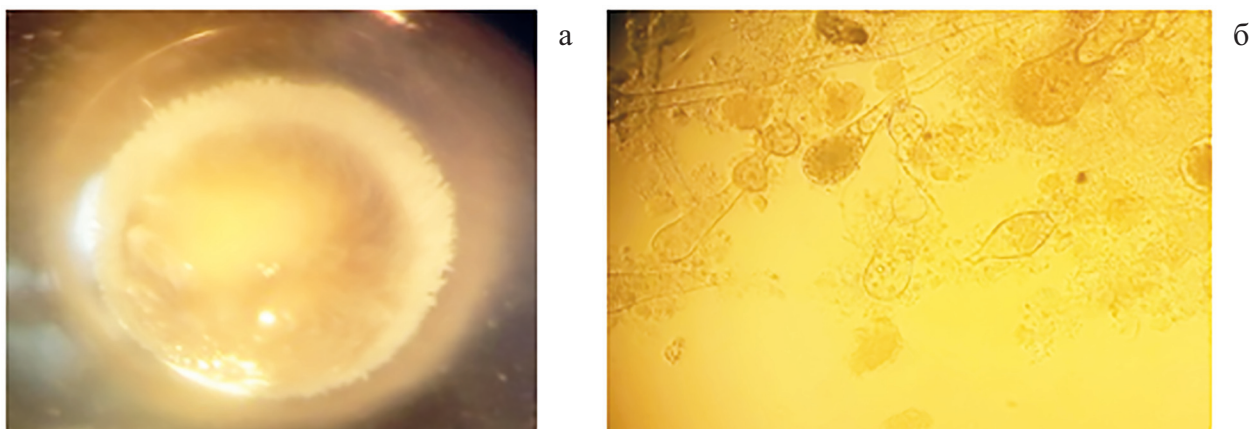


Рис. 4. Микромицеты *p. Saprolegnia*: поражение икры стерляди сапролегниозом (а); изолированная культура (б)

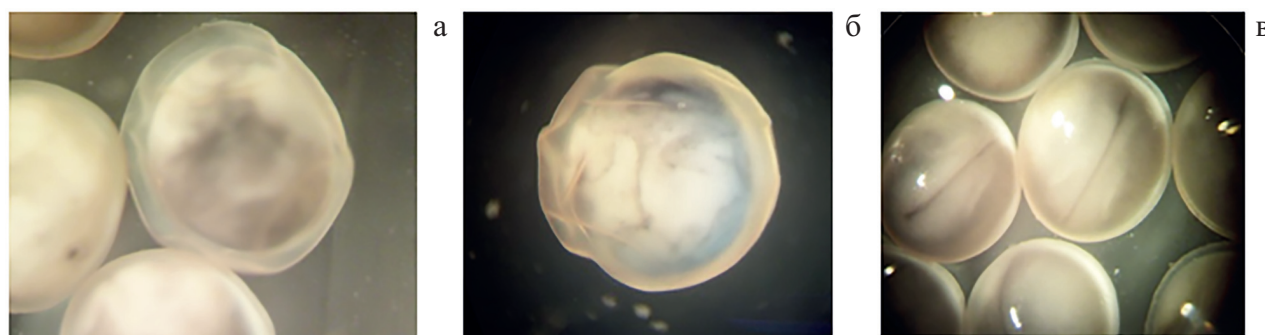


Рис. 5. Третий этап эксперимента. Внешний вид оплодотворенной икры стерляди: отслаивание поверхностного слоя после обработки перекисью водорода (23 стадия) (а); складчатая структура оболочки (22–23 стадия) (б); развитие икры без патологий (26 стадия) (в)

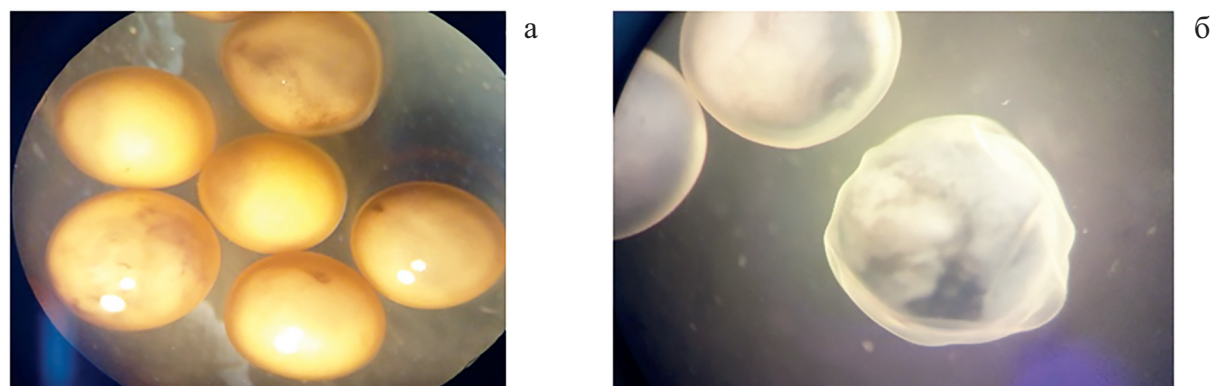


Рис. 6. Третий этап эксперимента. Внешний вид оплодотворенной икры стерляди после обработки растворами формалина: икра, остановившаяся в развитии (18 стадия) (а); складчатая структура оболочки (23 стадия) (б)

как установлено, что личинка, выклюнувшаяся после обработки икры этим веществом, нежизнеспособна.

Апробация ветеринарного препарата «Монклавит-1» показала, что все испытываемые концентрации приводили к переуплотнению оболочек икры, что в дальнейшем влияло на процесс выклева личинки. Наибольшую эффективность в борьбе с сапролегниевыми грибами показал 3,0 % раствор препарата «Монклавит-1», однако при данной концентрации зарегистрирован самый низкий уровень выклева личинки (1,8 %).

Положительный результат отмечен при использовании 0,03 % раствора перекиси водорода (снижение процента заражения икры на 8,0 %; по сравнению с другими испытываемыми растворами высокий процент выклева – 34,8 %), при этом отмечали действие раствора на оболочку икры. В связи с полученными результатами целесообразно провести эксперимент с перекисью водорода в условиях замкнутого водоснабжения, изменить и

расширить спектр ее концентраций, а также применить другую методику обработки.

Заключение

Для борьбы с микромицетами в период инкубации икры проводилась экспериментальная работа по поиску эффективного препарата – аналога органического красителя «Фиолетовый К». Установлено, что использование формалина в качестве препарата для борьбы с сапролегнией в период инкубации икры осетровых видов рыб нецелесообразно, так как данное вещество в испытанных концентрациях обладает сильным токсическим эффектом (100 % гибель личинок после выклева).

Дальнейшая работа с препаратом «Монклавит-1» должна быть связана с использованием новых концентраций и экспозиций для исключения негативного влияния на оболочки икры.

Применение перекиси водорода перспективно (при обработке раствора концентрацией 0,03 % отмечено наименьшее количество икры, зараженной микромицетами), но име-

ли место патологии при инкубации (остановка эмбрионального развития), поэтому необходимо апробировать растворы перекиси водорода наименьших концентраций при более длительной экспозиции.

Испытания препарата «Монклавит-1» и перекиси водорода должны проводиться в условиях замкнутого водоснабжения для максимального приближения к условиям инкубации икры на рыбоводных заводах.

Список литературы

1. Акимов Н. В. Атлас нарушений в гаметогенезе и строении молоди осетровых. / Н. В. Акимов, В. Б. Горюнова, Е. В. Микодина, М. П. Никольская, Г. И. Рубан, С. А. Соколова, В. Г. Шагаева, М. И. Шатуновский. М.: Изд-во ВНИРО. 2004. 120 с.
2. Головина Н. А. Ихтиопатология. / Н. А. Головина, Ю. А. Стрелков, В. Н. Воронин, П. П. Головин, Е. Б. Евдокимова, Л. Н. Юхименко. М.: Мир. 2003. 448 с.
3. Инструкция по химическому анализу воды прудов: Утв. М-вом рыб. хоз-ва СССР 20.03.84, 2-е изд., доп. М.: Изд-во ВНИИПРХ. 1985. 46 с.
4. Кузнецова Е. В. Применение препарата «Монклавит-1» для лечебно-профилактической обработки икры при сапролегниозе / Е. В. Кузнецова, Т. А. Нечаева, М. В. Мосягина, А. А. Печенкина. // Ученые записки УО ВГАВМ. Т. 52. Вып. 2. 2017. С. 72–76.
5. Ларцева Л. В. Сапролегниоз икры ценных видов рыб при искусственном разведении в дельте р. Волги: таксономия, экология, профилактика и терапия. / Л. В. Ларцева, О. В. Обухова, Ю. В. Алтуфьев. Астрахань: ИП Сорокин Р.В., 2017. 98 с.
6. Ларцева Л. В. Профилактика и терапия сапролегниоза осетровых и белорыбицы при искусственном их разведении / Л. В. Ларцева. Автореф. дис... канд. биол. наук. М., 1987. 24 с.
7. Литвинов М. А. Методы исследования микроскопических грибов пресных и соленых водоемов. / М. А. Литвинов, И. А. Дудка. Л.: Наука, 1975. 150 с.
8. Отраслевой стандарт ОСТ 16372-87 Вода для рыбоводных хозяйств. Общие требования и нор-

мы. От 1 апреля 1988. [утвержден Министерством рыбного хозяйства СССР (Минрыбхоз СССР)] [Электронный ресурс] – URL: https://standartgost.ru/g/%D0%9E%D0%A1%D0%A2_15.372-87.

9. Приказ министерства сельского хозяйства РФ № 377 от 25 августа 2015 г. «О внесении изменений в Методику расчета объема добычи (вылова) водных биологических ресурсов, необходимого для обеспечения деятельности рыболовных хозяйств, при осуществлении рыболовства в целях аквакультуры (рыбоводства), утвержденную приказом Минсельхоза России от 30 января 2015 г. № 25».

10. Приказ Россельхознадзора № 191 от 19.04.2012 г. № 191 «О лицензировании фармацевтической деятельности», с изменениями и дополнениями от 18.05.2012 г.

11. Рахконен Р. Здоровая рыба. Профилактика, диагностика и лечение болезней. / Рахконен Р., Веннерстрем П., Ринтамяки-Киннунен П., Каннел Р. Хельсинки: НИИ охот. и рыб. хоз-ва Финляндии, 2003. 180 с.

12. Рекомендации по организации противопаразитарных обработок в рыбоводстве от 7.10.1999 г.

13. Сборник инструкций и нормативно-методических указаний по промышленному разведению осетровых рыб в Каспийском и Азовском бассейнах. М.: Изд-во ВНИРО. 1986. 271 с.

14. Нечаева Т. А., Кузнецова Е. В., Варюхин А. В., Петропавловский А. Г. Способ повышения сопротивляемости икры к заболеваниям [Электронный ресурс] – URL: <http://www.freepatent.ru/patents/2421987-29.10.2018> г.

15. ТР ЕАЭС 040/2016. Технический регламент Евразийского экономического союза «О безопасности рыбы и рыбной продукции» (принят Решением Совета Евразийской экономической комиссии 18.10.2016 г. № 162).

16. ФЗ «О лицензировании отдельных видов деятельности» от 04.05.2011 г. № 99–ФЗ, с изменениями и дополнениями от 03.08.2018 г.; приказа Россельхознадзора от 19.04.2012 г. № 191.

17. Флоринская А.А. Материалы по видовому составу и экологии плесневых грибов – возбудителей сапролегниоза рыб в Ленинградской области. / А. А. Флоринская // Известия ГосНИОРХ, 1969. Т. 69. С. 103–123.

Объективная проверка слуха у животных. ВАЕР тест

С 2018 года ЧОУ ДПО "Институт Ветеринарной Биологии" проводит обучающий курс по объективной проверке слуха у животных, проведению ВАЕР-теста у собак, кошек и других видов животных. Курс включает в себя теоретическую и практическую программы. В теоретической части занятий, слушатели знакомятся с теорией процесса регистрации вызванных слуховых потенциалов и основами нейрофизиологии. За время практических занятий каждый курсант обучается самостоятельно проводить осмотр животного перед проведением ВАЕР теста, проверять племенные документы (для выписки сертификата допуска в разведение) непосредственно выполнять ВАЕР тест, фиксировать данные тестирования, интерпретировать данные тестирования, выписывать экспертное заключение о результатах ВАЕР теста. По окончании курсов слушатели, прошедшие итоговое испытание, получают СЕРТИФИКАТ СПЕЦИАЛИСТА по проведению ВАЕР теста.

Курс рассчитан на практикующих ветеринарных врачей. На курсах организована продажа книг по ветеринарии. Вы можете забронировать интересующие вас издания через форму на сайте, а оплатить и получить заказ в первый день занятий. Место проведения: Санкт-Петербург, ул. Ораниенбаумская, д. 3, лит. Б, ЧОУ ДПО "Институт Ветеринарной Биологии" (схема проезда)

Предварительная регистрация обязательна! Для регистрации на данный курс необходимо прислать заявку в свободной форме на адрес E-mail: virclin@mail.ru

DOI: 10.24411/2074-5036-2019-10040

УДК 619:616

Ключевые слова: иксодовые клещи, овоцидная активность, ларвицидная активность, *Ixodes ricinus*, s-фенвалерат, пиперонилбутоксид, цифлутрин.

Keywords: ixodes mites, ovocidal activity, larvicidal activity, *Ixodes ricinus*, s-fenvalerate, piperonyl butoxide, cyfluthrin.

Никанорова А. М.

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОВОЦИДНАЯ И ЛАРВИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ
НА ОСНОВЕ S-ФЕНВАЛЕРАТА И ПИПЕРОНИЛБУТОКСИДА В ФОРМЕ
ПОЛИМЕРНОГО МАТЕРИАЛА И РАСТВОРА НА ОСНОВЕ ЦИФЛУТРИНА НА ЯЙЦАХ,
ЛИЧИНКАХ И НИМФАХ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ ВИДА *IXODES RICINUS IN VITRO*
COMPARATIVE OVOCIDAL AND LARVICIDAL ACTIVITY OF PREPARATIONS BASED
ON S-FENVALERATE AND PIPERONYLBUTOXIDE IN THE FORM OF A POLYMERIC
MATERIAL AND A SOLUTION BASED ON CYFLUTRIN ON EGGS, LARVAS AND NYMPHS
OF IXODID MITES *IXODES RICINUS IN VITRO***

ФГБОУ ВО Калужский филиал РГАУ «Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева»

Адрес: 248007, Калужская обл., г. Калуга, ул. Вишневого, д. 27.

Kaluga Branch of the RSAU "Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev"

Address: 248007, Kaluga, Vishnevskogo str. 27

Никанорова Анна Михайловна к. б. н., доцент кафедры ветеринарии и физиологии животных.

E-mail: annushkanikanorova@gmail.com. Тел. 8-910-869-77-45

*Anna Mikhailovna Nikanorova, PhD of Biological Sciences, Associate Professor of the Veterinary and Animal
Physiology Department. E-mail: annushkanikanorova@gmail.com. Tel. 8-910-869-77-45*

Аннотация. Клещи семейства *Ixodidae* являются кровососами-эктопаразитами, переносят и накапливают множество возбудителей инфекций и инвазий, опасных для всех видов млекопитающих. Особенно чувствительный ущерб наносится сельскому хозяйству и животноводству в пики активности клещей, которые приходятся на весну и осень в центральном регионе РФ. Ежегодно во всем мире регистрируются вспышки заболеваний мелких домашних и сельскохозяйственных животных: анаплазмоза, нутталиоза, бабезиоза, пироплазмоза и др. Среди людей особенно распространен боррелиоз (болезнь Лайма). Без своевременной профилактической работы и лечения животные погибают, наносится значительный экономический ущерб. Ситуация усугубляется тем, что членистоногие, в том числе и иксодовые клещи, способны вырабатывать резистентность по истечении времени к различным действующим веществам, а эффективность профилактических обработок снижается. Поэтому разработка и внедрение в практику акарицидных препаратов на основе новых действующих веществ или комбинаций в настоящее время является очень актуальной. Также желательно чтобы препарат обладал овоцидным и ларвицидным действиями. В статье приведены результаты сравнительных лабораторных испытаний препаратов в форме полимерного материала на основе s-фенвалерата и пиперонилбутоксиды и раствора на основе цифлутрина против яиц, личинок и нимф иксодовых клещей вида *Ixodes ricinus*, собранных в природных биотопах Калужской области. В результате лабораторных испытаний акарицидов получены положительные результаты по овоцидной и ларвицидной активности препаратов. Участие в опыте генераций иксодовых клещей, выведенных от природных имаго иксодовых клещей, собранных в Калужской области, свидетельствует об эффективности препарата на клещах, обитающих в соседних областях, с учетом биолого-экологических особенностей иксодовых клещей и возможности активного внедрения в практику с профилактическими целями.

Summary. Mites of the *Ixodidae* family are blood suckers – ectoparasites; they transmit and accumulate many pathogens of infections and invasions that are dangerous for all types of mammals. Especially sensitive damage is caused to agriculture and animal husbandry at the peak of mite activity, which occurs in spring and autumn in the central region of the Russian Federation. Annually, worldwide outbreaks of diseases of small domestic and farm animals are recorded: anaplasmosis, nuttiosis, babesiosis, piroplasmosis, etc. Borreliosis (Lyme disease) is especially prevalent among people. Without timely preventive work and treatment, animals die, causing significant economic damage. The situation is aggravated by the fact that arthropods, including *Ixodes* ticks, are capable of producing resistance over time to various active substances, and the effectiveness of prophylactic treatments is reduced. Therefore, the development and implementation of acaricidal preparations based on new active substances or combinations is currently very relevant. It is also desirable that the drug possesses ovocidal and larvicidal actions. The article presents the results of comparative laboratory tests in the form of a polymeric material based on s-fenvalerate and piperonylbutoxide and a solution based on cyfluthrin against eggs, larvae and nymphs of *Ixodes* ticks of the *Ixodes ricinus* species collected in natural biotopes of the Kaluga region. As a result of

laboratory tests of acaricides, positive results were obtained on the ovocidal and larvicidal activity of the preparations. Participation in the experience of generation of ixodic ticks derived from natural imago ixodic ticks collected in the Kaluga region indicates the effectiveness of the drug on ticks living in neighboring areas, taking into account the biological and ecological features of ixodic ticks and the possibility of active implementation in practice for preventive purposes.

Введение

Иксодовые клещи имеют крайне широкий ареал распространения, являются вредными эктопаразитами – кровососами, переносят различные зооантропонозные инфекции и инвазии, поддерживают природные очаги болезней. Особый ущерб паразиты-кровососы наносят животноводству: портят 86 % кожевенного сырья, у рогатого скота снижается молочная продуктивность на 15 %, привесы мясного скота уменьшаются на 12 %, у рабочих животных значительно понижается работоспособность [1, 5, 6, 7].

Массовое нападение иксодовых клещей вызывает изменения общего состояния организма животных. Наблюдаются клинические признаки анемии, токсического отравления, животные угнетены и ослаблены, нарушается координация движений, ослабляются рефлексы, отсутствует блеск шерстного покрова. В клинической картине крови: эозинофилия, эритропения, нейтрофилия [2, 4, 5, 6].

По данным Комитета ветеринарии при правительстве Калужской области в настоящее время среди животных широко распространены трансмиссивные заболевания: бабезиоз, анаплазмоз, пироплазмоз.

В условиях масштабного животноводства не всегда оказывается своевременное лечение, животные страдают и гибнут.

Вопрос обязательной профилактики иксодидозов и сопутствующих заболеваний возникает особенно остро в периоды максимальной активности иксодовых клещей, в Центральном регионе РФ это весна и осень [3].

Актуальность профилактических мероприятий поддерживается способностью членистоногих приспосабливаться к различным действующим веществам химических препаратов, следовательно, ежегодно разрабатываются новые комбинации действующих веществ, оказывающие акарицидное воздействие.

На сегодняшний день основополагающим методом борьбы с трансмиссивными болез-

нями и иксодидозами является своевременная целевая инсектоакарицидная профилактическая обработка животных.

Цель нашей работы: провести лабораторные испытания по сравнительной овоцидной и ларвицидной активности препаратов на основе s-фенвалерата и пиперонилбутоксидна в форме полимерного материала и раствора на основе цифлутрина на яйцах, личинках и нимфах иксодовых клещей вида *Ixodes ricinus*.

Материалы и методы

Исследования проводились по общепринятым методикам [6, 8]. Использовались методические рекомендации, утвержденные Онищенко Г. Г. в 2003 г., сбор иксодовых клещей в природных биотопах в соответствии с методическими рекомендациями, утвержденными в 2012 и 2016 гг. (Бегина А. М., Василевич Ф. И., Козлова И. В.).

Основными действующими веществами исследуемого препарата №1 являются: s-фенвалерат и пиперонилбутоксид и препарата №2 цифлутрин и эфирное масло цитронеллы. Препарат №1 используется в производственных условиях в форме полимерных ушных бирок для крупного рогатого скота. Препарат №2 в форме раствора для нанесения вдоль позвоночного столба. Для опыта использовались яйца, личинки и нимфы иксодовых клещей вида *Ixodes ricinus*. Яйца и личинки были получены с помощью лабораторного культивирования от природных имаго иксодовых клещей, нимфы были собраны в природных биотопах Калужской области.

Опыт проводили в трех повторах, в каждой участвовало по 100 яиц, 100 личинок и по 10 нимф иксодовых клещей вида *Ixodes ricinus*, и аналогично в контрольных группах.

Опыт проводился при температуре 22°C и естественном освещении.

Препарат №1 использовали в виде полимерной ушной бирки; препарат №2 при контакте с фильтровальной бумагой, пропи-

Таблица 1

Овоцидная активность изучаемых препаратов *in vitro* вида *Ixodes ricinus*

№ п/п	Наименование препарата	Кол-во яиц вида <i>Ixodes ricinus</i>	% мертвых яиц					
			Время после обработки, часы					
			1 ч	4 ч	6 ч	24 ч	48 ч	72 ч
1	Препарат на основе s-фенвалерата и пиперонилбутоксида в форме полимерных ушных бирок (препарат №1)	100	0	0	20	52	100	100
2	Препарат на основе цифлутрина в виде раствора (препарат №2)	100	0	0	10	30	100	100

танной раствором из расчета 1 мл раствора на 100 м². В контрольном варианте на круги такой же фильтровальной бумаги наносилась дистиллированная вода.

Опыт длился 72 ч. Фиксировали состояние преимагинальных фаз через: 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч. К живым относили активных клещей, к полуживым – вяло ползающих, к мертвым – лежащих неподвижно с подогнутыми конечностями, не реагирующих на раздражители.

Результаты исследований и обсуждение

Исследуемый в опыте препарат №1 на основе s-фенвалерата и пиперонилбутоксида в форме ушных полимерных бирок по степени воздействия на организм относится к умеренно опасным веществам (3 класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76).

Исследуемый в опыте препарат №2 в форме раствора по степени воздействия на орга-

низм относится к малоопасным веществам (4 класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76).

Цифлутрин блокирует передачу нервных импульсов, вызывает нарушение координации движений, паралич и гибель членистоногих.

S-фенвалерат совместно с пиперонилбутоксидом легко проникает через кутикулу членистоногих, блокирует защитные системы членистоногих, обладает парализующим, репеллентным и антифидантным действиями.

При изучении овоцидной активности препарата №1 (табл. 1) выяснилось, что при непосредственном контакте с полимерной биркой погибло 100% яиц иксодовых клещей вида *Ixodes ricinus* через 48 ч, в опыте с препаратом №2 на основе цифлутрина 100% гибель произошла через 6 ч, что говорит о большей чувствительности яиц иксодовых клещей вида *Ixodes ricinus* к препарату №2.

Таблица 2

Ларвицидная активность изучаемых препаратов *in vitro* на личинках вида *Ixodes ricinus*

№ п/п	Наименование препарата	Кол-во личинок вида <i>Ixodes ricinus</i>	% мертвых личинок					
			Время после обработки, часы					
			1 ч	4 ч	6 ч	24 ч	48 ч	72 ч
1	Препарат на основе s-фенвалерата и пиперонилбутоксида в форме полимерных ушных бирок (препарат №1)	100	0	10	31	100	100	100
2	Препарат на основе цифлутрина в виде раствора (препарат №2)	100	80	100	100	100	100	100

Таблица 3

Нимфоцидная активность изучаемых препаратов in vitro на нимфах вида *Ixodes ricinus*

№ п/п	Наименование препарата	Кол-во нимф вида <i>Ixodes ricinus</i>	% мертвых нимф					
			Время после обработки, часы					
			1 ч	4 ч	6 ч	24 ч	48 ч	72 ч
1	Препарат на основе s-фенвалерата и пиперонилбутоксиды в форме полимерных ушных бирок (препарат №1)	10	0	8	18	100	100	100
2	Препарат на основе цифлутрина в виде раствора (препарат №2)	10	42	100	100	100	100	100

При изучении ларвицидной активности препарата №1 (табл. 2) на личинках вида *Ixodes ricinus* выяснилось, что при непосредственном контакте с полимерной биркой погибло 100% личинок через 24 ч, в опыте с препаратом №2 на основе цифлутрина 100% гибель произошла через 4 ч, следовательно, для уничтожения личинок можно применять препарат на основе цифлутрина, но с учетом биолого-экологических особенностей вида *Ixodes ricinus*, приуроченных к определенной территории.

При изучении нимфоцидной активности препарата №1 (табл. 3) на нимфах вида *Ixodes ricinus* выяснилось, что при непосредственном контакте с полимерной биркой погибло 100% личинок через 24 ч, в опыте с препаратом №2 на основе цифлутрина 100% гибель произошла через 4 ч, следовательно, для уничтожения нимф, также как и личинок, целесообразнее применять препарат на основе цифлутрина, но с учетом биолого-экологических особенностей вида *Ixodes ricinus*, приуроченных к определенной территории.

Высокую овоцидную активность препарата №1 можно объяснить способностью s-фенвалерата проникать через кутикулу членистоногих, а значит и через прочную яичную оболочку. При испытании препаратов яйца погибли в течение 2 суток, но через сутки в опыте с препаратом №1 погибло уже 52 % яиц, а в опыте с препаратом №1 на 22 % ниже.

Сравнивая данные таблиц 1-3, можно сделать вывод, что преимагинальные стадии иксодовых клещей вида *Ixodes ricinus*

к препарату №2 на основе цифлутрина чувствительнее, чем к препарату №1 на основе s-фенвалерата и пиперонилбутоксиды.

Заключение

Проведенные сравнительные лабораторные испытания двух препаратов на основе s-фенвалерата и пиперонилбутоксиды (препарат №1) и на основе цифлутрина (препарат №2) показали высокую овоцидную и ларвицидную активность эффективности изучаемых препаратов. Все подопытные личинки, нимфы и яйца иксодовых клещей вида *Ixodes ricinus* погибли в течение двух суток, что является высоким показателем, следовательно, препараты можно рекомендовать к активному испытанию и внедрению в производственных условиях.

Выявленные особенности чувствительности преимагинальных фаз иксодовых клещей свидетельствуют о необходимости при проведении профилактических мероприятий учитывать биологические, фауно-экологические особенности каждого вида на определенной территории.

Учитывая пики активности иксодовых клещей в Центральном регионе РФ, на примере Калужской области, которые приходятся для вида *Ixodes ricinus* на вторую-третью декады мая с некоторыми небольшими вариациями в зависимости от погодных условий каждого года, целесообразно обрабатывать животных во вторую-третью декады мая и в течение лета, пока преимагинальные стадии развиваются, растут и питаются.

Список литературы

1. Балашов Ю. С. Кровососущие клещи (Ixodidae) – переносчики болезней человека и животных. / Ю. С. Балашов. Л., 1967. 320 с.
2. Бегина А.М. Сбор, учет и лабораторное культивирование иксодовых клещей / А. М. Бегина, Ф. И. Василевич, И. В. Козлова. М., 2016. 42 с.
3. Бегина А.М. Фауна и экология иксодовых клещей Калужской области и меры борьбы с ними/ диссертация ... кандидата биологических наук : 03.02.11 / А.М. Бегина. Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я. Р. Коваленко Россельхозакадемии. М., 2013
4. Кербабаяв Э. Б. Экологический тип паразитохозяйственных отношений иксодовых клещей / Э. Б. Кербабаяв, В. Н. Шевкопляс // Ветеринария. 2004. № 8. С. 33–36.
5. Никанорова А. М. Результаты испытаний инсектоакарицидного препарата на основе s-фенвалерата в условиях Калужской области / А. М. Никанорова // Ветеринария и кормление. 2019. № 1. С. 36–39.
6. Онищенко Г. Г. Методы определения эффективности инсектицидов, акарицидов, регуляторов развития и репеллентов, используемых в медицинской дезинфекции. М., 2003.
7. Шевкопляс В. Н. Фауна иксодовых клещей и экологобиологические основы мер борьбы с ними в условиях Краснодарского края: дис. ... д-ра вет. наук: 03.00.19 / Шевкопляс Владимир Николаевич. М., 2009. 230 с.
8. Сбор, учет и лабораторное культивирование иксодовых клещей: методические рекомендации / Никанорова А. М., Василевич Ф. И., Козлова И. В. М., 2016. 38 с.

ПРЕДСТАВЛЯЕМ КНИГУ:

«Ультразвуковое и рентгенологическое исследование брюшной полости мелких домашних животных»

Издательство: ЧОУДПО «Институт Ветеринарной Биологии», Санкт-Петербург, 2016

Тираж: 500 экз.

Формат: 210 x 297 мм, твёрдый переплет, 760 с. илл.

Данная монография обобщает многолетний опыт работы сотрудников Института Ветеринарной Биологии в области УЗИ и рентгенодиагностики, а также многолетний опыт проведения курсов повышения квалификации для ветеринарных специалистов по УЗИ и рентгенологии.

Кроме текстовой информации, изложенной в доступной форме, книга содержит большое количество иллюстрационного материала: оригинальные схемы, облегчающие понимание сложных процессов, сканы ультразвуковых исследований, рентгеновские снимки, фотографии макро- и гистопрепаратов.

Одной из отличительных особенностей данного издания является то, что материал, представленный в книге, дан в сравнительном аспекте. Органы и системы, норма и патологического исследования и показаны в виде макропрепаратов.

Книга рассчитана на ветеринарных специалистов, работающих в области ультразвуковой и рентгенологической диагностики, на врачей общей практики, а также студентов, планирующих специализацию в области УЗИ и рентгенодиагностики.

Стоимость:

Розничная цена 1 экз. – 9600 руб.

Для оптовых покупателей – система скидок.

Где купить в Санкт-Петербурге:

Институт Ветеринарной Биологии по адресу: ул. Ораниенбаумская, д. 3-Б (ст. м. "Чкаловская")
Т. 812 232-55-92 invetbio@mail.ru.

По вопросам оптового приобретения книг и журналов издательства ЧОУДПО «Институт Ветеринарной Биологии» обращаться по e-mail: invetbio@mail.ru; т. (812) 232-55-92.



DOI: 10.24411/2074-5036-2019-10041

УДК 615.91.63:632/638.158.2

Ключевые слова: медоносные пчелы, пестициды, инсектициды, интоксикация пчел, газовая хроматография, пробоподготовка QuEChERS, подмор пчелиный

Keywords: honey bees, pesticides, insecticides, intoxication of bees, gas chromatography, sample preparation QuEChERS, the corpses of bees

Роик Б. О., Ермилов И. В.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕСТИЦИДОВ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ
В ПОДМОРЕ МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ ПОСЛЕ ЛЕТАЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ
DETERMINATION OF PESTICIDES BY GAS CHROMATOGRAPHY IN THE CORPSES
OF HONEY BEES AFTER LETHAL INTOXICATIONS**

ОБУ «Курская областная ветеринарная лаборатория»
Адрес: 305003, Россия, Курск, Верхнеказачий пер., д. 9
RBI «Kursk regional veterinary laboratory»
Adress: 305003, Russia, Kursk, Verhnykazatsky st. h. 9

Роик Богдан Олегович, ведущий инженер химико-токсикологического отдела,
E-mail: bogdan.bioCHEM.roik@mail.ru. Тел.: 8-910-216-8238.
Roik Bogdan Olegovich, leading engineer of chemical and toxicological department.
E-mail: bogdan.bioCHEM.roik@mail.ru. Tel.: 8-910-216-8238.

Ермилов Иван Валерьевич, руководитель учреждения, кандидат ветеринарных наук.
Тел.: 8-909-238-6260.
Ermirov Ivan Valer'evich, Director of the head of the institution, PhD of Veterinary Sciences.
Tel.: 8-909-238-6260.

Аннотация. Определение пестицидов в пчелином подморе является весьма актуальной, и в то же время трудной для практической реализации задачей. Трудность, в основном, заключается в отсутствии утвержденных методических указаний или ГОСТов по проведению соответствующей пробоподготовки биоматериала и газохроматографического анализа. Таким образом, в работе представлена разработка методики определения хлор- и фосфорорганических пестицидов в подморе пчел методом газовой хроматографии. Проведена валидация процесса подготовки патматериала пчел по современному и эффективному методу QuEChERS. Разработанный и прошедший валидацию метод определения пестицидов в трупах пчел носит рекомендательный характер и может быть использован ветеринарными лабораториями при возникновении вспышек массовой гибели медоносных пчел.

Summary. Determination of pesticides in bee corpses is a very important, but at the same time difficult for practical implementation task. The difficulty mainly lies in the absence of approved guidelines for the appropriate sample preparation of biomaterial and gas chromatographic analysis. Thus, the paper presents the development of methods for determining pesticides in bee subpestilence by gas chromatography. Validation of the process of preparation of bee pathological material for a modern and efficient QuEChERS method was conducted. Developed and validated method for determination of pesticides in the corpses of bees is advisory and can be used by veterinary laboratories in the event of outbreaks of mass death of honey bees.

Введение

Влияние пестицидов на организм пчел. Садоводам и фермерам довольно часто приходится сталкиваться с проблемами, связанными с порчей растений и плодов по причине образования насекомых-вредителей, грибковых и прочих неблагоприятных образований. Защитить свой урожай от наплыва таких вредителей и различных случаев, возможно только с применением специальных агрохимических препаратов – инсектици-

дов, которые обладают уничтожающим действием на вредных насекомых, включая их потомство. Но если для борьбы с насекомыми-вредителями, их личинками и яйцами, эффективными препаратами являются ядохимикаты из класса инсектицидов, то для полезных насекомых они оказывают вредное и губительное действие, в большинстве случаев летальное. К тому же, у многих вредных насекомых уже выработана генетическая устойчивость к большинству препа-

ратов идентичного действия и состава, что не сказать, например, о пчелах.

Причинами возникновения летальной интоксикации пчел может стать неправильная организация трудовой деятельности агрохимических компаний при обработке сельскохозяйственных угодий и полей. Так же, известно длительные токсикозы пчел, протекающие практически без симптомов, которые возникают вследствие поедания пчелами меда, с занесенным в улей вместе с пыльцой летальным количеством инсектицидов [8, 9, 11]. Причинами отравления пчел пестицидами могут быть различные факторы, чаще всего обусловленные некомпетентностью персонала агрофирм, проводящих обработку полей [8]. Пчелы являются весьма чувствительными насекомыми даже для незначительных микроколичеств пестицидов, а именно инсектицидного ряда. В итоге, после того, как ядохимикаты попадают на цветочные растения, пчелы заносят собранную отравленную пыльцу и нектар в улей. Поэтому пчелы все чаще подвержены неумышленной летальной интоксикации различными пестицидами даже и в зимний период. Агрохимикаты, попавшие в мед, которым пчелы кормятся, убивают их спустя некоторое время. Выжившие после интоксикации пчелы способны рожать трутней с мутациями или иными генными дефектами. Основным признаком токсикоза является массовая гибель летных пчел, причем основная часть погибает сразу же в поле, другие особи, долетев до улья, погибают возле него [8, 11].

В основном, сельское хозяйство при обработке полей использует ядохимикаты контактного и системного действия (пиретроидные, хлор- и фосфорорганические пестициды), которые проникают через наружные защитные покровы пчел [12]. Фосфорорганические ядохимикаты, по числу соединений, применяемых в сельском хозяйстве, занимают первое место наряду с другими классами органических химикатов. Отдельные группы данного класса пестицидов, являются частыми виновниками отравления медоносных пчел при обработке сельхозкультур [6]. Даже при незначительном отравлении симптомы выражаются в большинстве

случаев в возбуждении центральной нервной системы, в параличе и судорогах конечностей, в потере координации движений насекомого, и почти всегда приводит к интоксикации и гибели пчелы.

В составе пчелиного подмора чаще всего содержатся компоненты пыльцы, воск, маточное молочко, прополис, остатки меда, аминокислоты, ферменты, гормоноподобные вещества, хитин, жир, пищевые волокна и другие составляющие. При этом известно, что наружный покров насекомых состоит из кутикулы и гиподермы. Кутикула представляет собой прозрачную влажную оболочку, которая помогает насекомым сохранить водный баланс при помощи секреторных выделений, распределенных по всей поверхности организма насекомого. Состоит кутикула из эпикутикулы, экзокутикулы и эндокутикулы. Все три слоя кутикулы являются своего рода барьерами, выполняющими защитную функцию. Проникновение ядовитых веществ в тельце пчелы происходит через верхние покровы и зависит от степени проницаемости самой кутикулярной оболочки. В основном, проницаемость покровов кутикулы обуславливается толщиной и органическим составом, в который обычно входят такие компоненты, как липоиды, хитин и протеин. Экзокутикула и эндокутикула выполняют защитную функцию от механических частиц, попадающих в насекомое. Эпикутикулу следует считать первым барьером, стоящим на пути проникновения контактных инсектицидов в организм пчелы. Гиподерма является внутренней оболочкой и имеет всего один слой, образованный подкутикулярными клетками [5].

Проникновение инсектицидов через покровы тельца пчелы связано в основном с явлением проницаемости живых мембран, а не с эффектом обычной диффузии [2, 3, 5]. К тому же, задержка инсектицидной пыли на лапках, крыльшках и ворсинках тельцев медоносных пчел способна попадать в мед вместе с пыльцой, а также заражать других особей. Считается, что в местах расположения щетинок и волосков тела насекомого, кутикула имеет тонкий слой, через который проникновение инсектицидов происходит

гораздо быстрее. На рисунке 1 представлен вид ворсинок, расположенных на крылышках пчел.

У пчел также весьма уязвимыми и чувствительными являются лапки, так как они покрыты щетинками, которые удерживают частицы пестицидов, а также тонким слоем кутикулярной оболочки, через которые происходит интоксикация контактным инсектицидом. На рисунке 2 представлены щетинки, покрывающие лапки пчел.

Многие исследователи ссылаются на то, что пестициды из класса хлорорганических препаратов являются весьма губительными для насекомых. Интоксикации чаще всего подвергаются и полезные насекомые – медоносные пчелы [5, 11, 14, 16,17].

В настоящее время существует и применяется в сельском хозяйстве достаточно много пестицидов, относящихся к различным группам и классам опасности. В основном, широкое применение в сельском хозяйстве приобрели хлор-, фосфор-, ртутьорганические соединения, а также в последнее время активное применение отводится пиретроидным инсектицидам. Последние, в свою очередь, обладают широким спектром губительного действия для насекомых-вредителей, но являются весьма токсичными для пчел и других полезных насекомых.

Значительный ущерб пчеловодству и резкий упадок численности насекомых-опылителей приносят неправильное и некорректное применение инсектицидов. Профилактика отравлений пчел может быть достигнута только при правильном использовании пестицидов, хранении их на складе по соответствующим нормам и технологиям, а также в утилизации отработанных контейнеров и пакетов полным сжиганием [8].

В периоды массовых обработок агрофирмам следует проводить специальные мероприятия, которые подразумевают извещение пчеловодов о предстоящей химической обработке, вследствие которого пасеки должны быть перенесены на безопасное расстояние (5–7 км) от места использования ядохимикатов. В свою очередь, пчеловоды обязаны обеспечить соответствующие меры по защите ульев и изоляции медоносных пчел. При

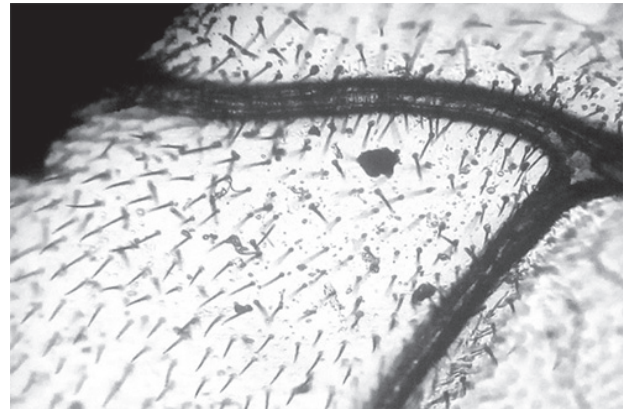


Рис. 1. Ворсинки, расположенные на крылышках пчел, на которых происходит удерживание мелких частиц контактных инсектицидов

этом каждая пасека должна иметь ветеринарно-санитарный паспорт, подписанный и заверенный главным ветеринарным врачом [1, 4, 6, 7]. Изолирование пчелиных семей осуществляется по специально разработанным пчеловодческим приемам (перевозка пасек, изоляция пчел в гнезде, изоляция при помощи сетки и др.), а контроль за данной операцией осуществляется ветеринарной службой и службой по защите растений [1, 8].

Определение пестицидов в пчелином подморе является весьма актуальной, но в то же время трудной для практической реализации задачей. Трудность, в основном, заключается в отсутствии утвержденных методических указаний и ГОСТов по проведению соответствующей пробоподготовки биоматериала и газохроматографического анализа. Данную проблему, вызванную отсутствием конкретной методики пробоподготовки, возможно



Рис. 2. Щетинки, покрывающие лапки пчел

решить только при точном определении принадлежности патматериала подмора пчел и классификацию самого биоматериала. Таким образом, классифицированный биоматериал подмора, логически, можно будет подготавливать и анализировать по аналогии с образцами схожей формы и консистенции, осуществив перенос методики исследования с соответствующим валидационным подтверждением. Большинство применяемых пестицидов для сельского хозяйства подвержены детоксикации через 1–7 дней, в зависимости от класса опасности пестицидов, после чего они становятся безвредными для пчел [1].

Отравление пчел пестицидами, пусть даже неумышленное, влечет за собой уголовную ответственность аграриев, обрабатывающих поля без предварительного предупреждения пасечников. В основу разработки и тестирования любого агрохимиката должна быть положена концепция определения токсикологического влияния на организм пчел. Следует отметить, что многие производители инсектицидных препаратов все же указывают на этикетке класс опасности и влияние активного вещества на пчёл. Однако, трудность, с которой предстоит столкнуться как пасечнику, так и исследователю, состоит в сложности подсчета ущерба, вызванного протравкой полей ядохимикатами, пагубно влияющими на пчёл. К тому же, во-первых, гибель пчел должны подтвердить соответствующие органы власти и ветеринарная служба. Во вторых, доказать гибель пчел при судебном разбирательстве, будет весьма трудно из-за отсутствия все тех же утвержденных государственных химико-аналитических методик, чем должен руководствоваться исследователь при определении пестицидов в биоматериале подмора пчел. При явных признаках отравления пчел, когда лабораторная диагностика не может быть проведена из-за отсутствия соответствующей методики определения пестицидов в подморе пчел, решение ветеринарной комиссии о предполагаемой причине гибели пчел является окончательным результатом [7]. Несмотря на то, что Федеральный закон «О пчеловодстве» был принят в РФ, районы и областные

центры по-прежнему испытывают нехватку экспертов и ветеринарных врачей, специализирующихся на отрасли пчеловодства, особенно связанной с интоксикацией и гибелью пчел. В основном отсутствуют специалисты по хроматографическим исследованиям, область которых направлена на определение остаточного количества пестицидов в трупах медоносных пчел.

Методические рекомендации, представленные НИИ Пчеловодства, описывают определение пестицидов в трупах пчел, основанные на качественных исследованиях и фотометрическом и химическом анализе, при этом достаточно хорошо продемонстрирована подготовка патматериала пчел к исследованиям различными методами экстракции органическими растворителями [6].

Цель работы состояла в адаптации и оптимизации метода QuEChERS в пробоподготовке биоматериала к исследованию, а также в получении валидационных характеристик для газохроматографического анализа пестицидов в пчелином подморе.

Материалы и методы

Работа была выполнена в химико-токсикологическом отделе ОБУ «Курская областная ветеринарная лаборатория». Разработку и валидацию методики определения пестицидов в пчелином подморе проводили с применением современного оборудования и метода пробоподготовки. Таким образом, патологический материал пчел подготавливали к анализу на пестициды в соответствии с методическими рекомендациями метода QuEChERS (КУЭЧЕРС, Интерлаб, IL-5650-Экстракционный набор VetExQ, или другой стандартизованный QuEChERS). Определение пестицидов осуществлялось методом высокоэффективной газовой хроматографии на приборе «Хромос ГХ-1000» (Россия, ООО «Хромос»), с детектором по захвату электронов (ЭЗД) и капиллярной колонкой «VF-1701» for Pesticides (30м×0.32мм×0.25мкм).

Отбор патматериала пчел для анализа. Для подтверждения токсикоза и отравления медоносных пчел пестицидами в ветеринарную лабораторию следует направлять пробы трупов пчел, меда, пыльцы или перги,

а также растения с обработанного участка для одновременного и сравнительного анализа. Соответственно, отбор проб и пересылка материалов осуществляется по установленной методике под контролем ветеринарного специалиста. Вместе с пробами в ветеринарную лабораторию направляется сопроводительный документ, в котором следует указать описание содержимого и предполагаемый пестицид или препарат, на который необходимо провести исследование. К сопроводительному письму должен быть прикреплен комиссионный акт о предположительном отравлении пчел. По установленным нормам, срок предоставления проб для исследования на пестициды не должен превышать 5–7 суток с момента отбора материала [8]. Для фосфорных пестицидов не более 3 суток.

Установлено, что для анализа на пестициды следует предоставлять в лабораторию среднее количество одной пробы до 300–500 пчел (около 25 г) от одной пчелиной семьи, около 300 г свежесобранного меда, сразу же после обнаружения токсикоза пчел, до 200 г перги в соте и около 500 г собранной зеленой массы с обработанного ядохимикатами участка. Каждый образец пробы должен быть упакован и предоставлен в соответствующем виде, то есть быть опечатанным, пронумерованным и с указанным номером пчелиной семьи. Также упаковка подразумевает исключение возможного соприкосновения и перемешивания проб в процессе доставки.

Методика пробоподготовки QuEChERS (рекомендации). Основной проблемой при анализе пестицидов в подморе пчел является отсутствие утвержденной методики пробоподготовки или методических рекомендаций, с описанием газохроматографических условий, приемлемых для определения ядохимикатов. Ко всему прочему, стоит отметить и то, что патологический материал подмора пчел трудно соотнести с конкретным биоматериалом, матрица которого имеет аналогичный компонентный состав, структуру и тип волокон, а также консистенцию, что позволило бы без труда определить подходящую методику пробоподготовки и условия хроматографического анализа при помощи переноса и верификации.

В данной работе была использована методика пробоподготовки QuEChERS, основанная на быстрой экстракции искомым компонентов при помощи растворителей и специально подобранных по составу и соотношению солей, а также качественной очистке аликвоты от мешающих анализу примесей (жиров, восков, пигментов и т.д.), что обеспечивается наличием надлежащего сорбента, после чего проба готова к измерению. Само слово QuEChERS является аббревиатурой, образованной от слов (quick, easy, cheap, effective, rugged, safe), характеризующих достоинства данного метода по его эффективности и точности. В силу того, что утвержденные методические указания на подготовку патматериала пчел к хроматографическому анализу пестицидов практически отсутствуют, то данный метод QuEChERS является актуальным и вполне реализуемым вариантом, который может быть использован для осуществления поставленной цели. Методические рекомендации по выделению пестицидов из биологической матрицы пчелиного подмора представлены ниже.

Для анализа следует тщательно перемешать и отобрать среднюю часть пробы пчелиного подмора. Из общей массы отмерить около 1 г (± 0.1 г) биологического образца и максимально гомогенизировать в пластиковой пробирке. При необходимости проверки процента извлечения, к содержимому пробирки добавить 1 мл смеси стандартных образцов пестицидов с концентрацией, равной средней точке градуировки.

Экстракцию проводить внесением в пробирку от 5 до 10 мл ацетонитрила, после чего, в течение 1 минуты интенсивно встряхивать. Добавить 0.5 мл концентрированной соляной кислоты и перемешать. После экстракции растворителем добавить одну упаковку буферных солей из набора QuEChERS для усиленной экстракции компонентов. Центрифугировать в течение 10 минут при скорости 3500 об/мин. Аликвоту верхнего слоя перенести в пробирку из набора объемом 15 мл, которая содержит сорбент для очистки экстракта. Провести повторную экстракцию 3–5 мл ацетонитрилом, центрифугировать

Условия хроматографирования пестицидов

Прибор	Газовый хроматограф Хромос «ГХ-1000»
Инжектор/испаритель	Капиллярный лайнер, температура инжектора 280°C
Септа на инжекторе	Высокотемпературная красная
Детектор	Детектор электронного захвата (ЭЗД), температура детектора 300°C
Газ-носитель	Газ азот, режим постоянного давления 2 кгс/см ²
Деление потока (сброс)	31 мл/мин, 4:1
Поддув газа в детектор	40 мл/мин
Колонка	Кварцевая, капиллярная VF-1701 for Pesticides, 30 м×0.32 мм×0.25 мкм
Температура колонки	Начальная температура 100°C, задержка 1.5 минуты, конечная температура 300°C, задержка 1.5 минуты, скорость подъема температуры 10°/мин Время анализа 23 минуты
Объем пробы	1.0 мкл аликвоты инжeksiруется в систему
Дозирование	Ручное, микрошприц 10 мкл

и объединить слои в пробирке с сорбентом. Далее эту пробирку следует интенсивно встряхивать, а затем при тех же условиях центрифугировать. Верхнюю часть аликвоты упарить досуха в токе воздуха при 40-50°C. Сухой остаток восстановить в 1 мл н-гексана, пропустить через одноразовый шприцевой фильтр с порами 0.45 мкм в виалу для последующего хроматографического анализа.

Условия хроматографирования (рекомендации). Условия для хроматографического анализа пестицидов в биологическом материале указаны в таблице 1.

Выход анализируемых пестицидов: Гексахлорбензол (ГХБ), альфа-ГХЦГ, гамма-ГХЦГ, метафос, фосфамид, карбофос, 4.4-ДДЭ, 4.4-ДДД, 4.4-ДДТ.

При анализе патматериала необходимо проводить исследование холостого образца, а затем образца реальной пробы. На рисунке 3 представлена хроматограмма контрольного «холостого» образца пчелиного подмора, не содержащая пиков определяемых пестицидов.

На рисунке 4 представлена хроматограмма с расшифровкой пиков намеренно внесенных в пробу хлорорганических и фосфорорганических пестицидов на фоне неопределяемых пиков биологической матрицы пчелиного подмора.

Результаты исследований

Валидация методики. Валидация адаптированного и оптимизированного метода определения пестицидов в пчелином патматериале проводилась по основным валидационным характеристикам – селективность, линейность, воспроизводимость, предел количественного определения и степень извлечения [15].

Название метода: Определение пестицидов методом газовой хроматографии в подморе медоносных пчел после летальной интоксикации.

Аналит. Хлорные и фосфорные пестициды: гексахлорбензол; альфа-, гамма-гексахлорциклогексан; 4.4-ДДД; 4.4-ДДЭ; 4.4-ДДТ; метафос; карбофос; фосфамид.

Матрица. Биоорганический патологический материал пчелиного подмора.

Тип валидации. Внутренняя валидация.

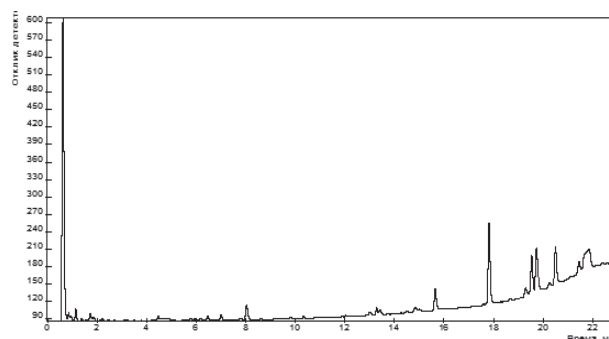
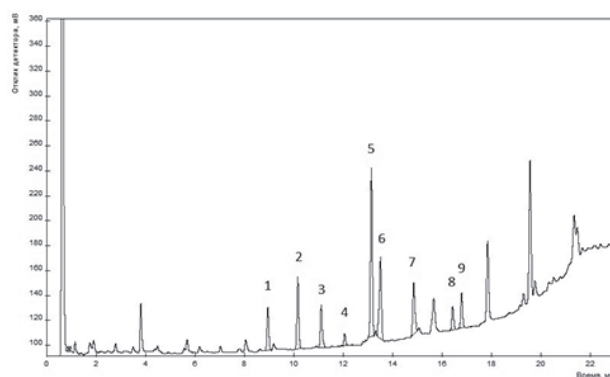


Рис. 3. Хроматограмма контрольного образца пчелиного подмора

Селективность. Для определения специфичности хроматографической системы был проведен анализ 5 подготовленных по методу QuEChERS чистых образцов пчелиного подмора и образца чистого подмора с прибавлением стандартного раствора смеси хлорных и фосфорных пестицидов с концентрацией 0.500 мкг/мл. На хроматограммах чистых образцов подмора не наблюдалось характерных пиков с временами удерживания, соответствующих временам удерживания хлор- и фосфорорганических пестицидов. Хроматограмма с добавкой хлорных и фосфорных пестицидов содержала пики интересующих веществ, соответствующие временам выхода перечисленных пестицидов.

Линейность. Для определения линейности всех определяемых в работе пестицидов проводился анализ 4 чистых образцов пчелиного подмора, в каждый из которых прибавлялся стандартный раствор смеси 9 пестицидов до получения концентраций: 0 мкг/мл, 0.2 мкг/мл, 0.5 мкг/мл, 1 мкг/мл. По полученным значениям были построены калибровочные графики, которые охватывали диапазон от 0 до 1000 нг/мл (0, 200, 500, 1000 нг/мл). График строили методом линейного регрессионного анализа. Калибровочный график отображает зависимость относительного отклика на искомые вещества от концентрации этих веществ.

Так как градуировочный раствор содержал смесь 9 пестицидов, то таблица 2 содержит формулы регрессионных уравнений линейности с поправками и коэффициенты корреляции (R²) для каждого анализируемого пестицида.



1-Гексахлорбензол (ГХБ), 2-альфа-ГХЦГ, 3-гамма-ГХЦГ, 4-метафос, 5-фосфамид, 6-карбофос, 7-ДДЭ, 8-ДДД, 9-ДДТ
Рис. 4. Хроматограмма хлорорганических и фосфорорганических пестицидов в биологической матрице пчелиного подмора

Степень извлечения и точность воспроизводимости. Для оценки степени извлечения и воспроизводимости результатов определения пестицидов в пчелином подморе проводился анализ 2 контрольных образцов пчелиного подмора с прибавлением стандартного раствора смеси пестицидов до получения концентраций 200 нг/мл и 500 нг/мл. Для получения более точной оценки каждый образец хроматографировался по 3 раза. Количественное определение проводили по калибровочной кривой. Данные по воспроизводимости результатов и степени извлечения оценивались по относительному стандартному отклонению (СОС_n=5). Результаты, полученные по степени извлечения и воспроизводимости, представлены в таблице 3. Таким образом, из таблицы видно, что для всех 9 пестицидов отмечаются достаточно высокие степени извлечения и точность воспроизведения

Таблица 2

Регрессионные уравнения и коэффициенты корреляции пестицидов

№	Название пестицида	Регрессионное уравнение	Коэфф. корр., R ²
1	Гексахлорбензол	+ 0.0364 * X - 0.0264	0.997
2	Альфа-ГХЦГ	+ 0.0250 * X - 0.0948	0.998
3	Гамма-ГХЦГ	+ 0.0347 * X - 0.0570	0.999
4	Метафос	+ 0.1993 * X - 0.8330	0.986
5	Фосфамид	+ 0.1063 * X + 0.4649	0.989
6	Карбофос	+ 1.0484 * X - 0.6070	0.992
7	ДДЭ	+ 0.0387 * X - 0.0366	0.998
8	ДДД	+ 0.0685 * X - 0.0309	0.997
9	ДДТ	+ 0.0518 * X + 0.0030	0.999

данных. Полученные величины ОСО соответствуют норме не более 20%.

Предел количественного определения. Хроматограмма предела количественного определения 9 пестицидов в пчелином подморе представлена на рисунке 5.

Предел количественного определения разработанного метода определялся на основании данных линейности и точности воспроизводимости. Таким образом, предел количественного определения для всех пестицидов составил 200 нг/мл. Очередность выхода пиков пестицидов соответствующая.

Обсуждение результатов

Химический токсикоз пчел или отравление медоносных пчел инсектицидами в большинстве случаев проявляется внезапно, вследствие чего насекомые без явных клинических признаков погибают. В некоторых случаях пчелы успевают долететь до улья, но погибают возле него.

Определено, что интоксикация пчелосемей пестицидами чаще всего происходит в результате грубых нарушений установленных правил проведения агрохимизации сельскохозяйственных культур, а также в отсутствие информации и своевременного оповещения

Таблица 3

Степени извлечения пестицидов и воспроизводимость результатов

Внесено	200 нг/мл		ОСО, %	500 нг/мл		ОСО, %
Аналит	Найдено, %	Среднее найденное	Для n=3	Найдено, %	Среднее найденное	Для n=3
Гексахлорбензол	85.6	85.4%	0.29	82.1	82.2%	0.19
	85.1			82.4		
	85.4			82.2		
Альфа-ГХЦГ	90.2	90.1%	0.50	90.4	90.1%	0.36
	89.6			90.3		
	90.5			89.8		
Гамма-ГХЦГ	93.2	92.9%	0.32	95.2	95.3%	0.28
	92.9			95.6		
	92.6			95.1		
Метафос	81.5	81.1%	0.43	83.1	83.1%	0.30
	80.8			83.3		
	81.1			82.8		
Фосфамид	86.3	86.0%	0.30	84.1	83.7%	0.42
	85.8			83.4		
	85.9			83.7		
Карбофос	90.2	90.2%	0.33	92.6	92.4%	0.22
	90.5			92.2		
	89.9			92.4		
ДДЭ	93.2	92.8%	0.38	95.2	95.3%	0.10
	92.8			95.4		
	92.5			95.3		
ДДД	97.4	97.1%	0.31	95.2	95.0%	0.21
	96.8			94.9		
	97.1			94.8		
ДДТ	98.2	98.5%	0.26	97.9	98.2%	0.26
	98.5			98.4		
	98.7			98.2		

пчеловодов о месте и времени обработок полей в момент массового лёта пчел. И если в случае пищевых продуктов существуют нормы содержания остаточных микроколичеств для большинства пестицидов, то патологический материал, в нашем случае пчелиный подмор, этих норм лишен. На данный момент информация по нормам на патологический материал, особенно на отравление пчел пестицидами, отсутствует.

В работе использовался газовый хроматограф «Хромос ГХ-1000» с детектором по захвату электронов (ЭЗД). Данный детектор является селективным по отношению к хлорсодержащим пестицидам. Было определено, что ЭЗД так же способен определять и фосфорсодержащие пестициды, причем обеспечивая отличный сигнал при определении веществ этого класса. Условия хроматографического анализа подобраны на основании многочисленных опытов.

Для калибровки системы хроматографа готовили смесь стандартных градуировочных растворов с концентрациями 0,2; 0,5 и 1 мкг/мл для хлор- и фосфорорганических пестицидов. В результате измерений были получены калибровочные графики для каждого пестицида с диапазоном концентраций 0 нг/мл, 200 нг/мл, 500 нг/мл и 1000 нг/мл. Хроматографические пики определены по временам удерживания пестицидов согласно установкам прибора. Пробоподготовка – оптимизированная процедура по эффективному методу пробоподготовки QuEChERS, прошедшая внутрилабораторную валидацию. В исследованиях пробы с добавкой пестицидов использовался совершенно чистый биоматериал пчелиного подмора, в котором ранее не обнаружались остатки определяемых пестицидов.

Ввиду отсутствия конкретных методик пробоподготовки пчелиного патматериала, с последующим газохроматографическим методом определения пестицидов, была разработана методика, в которой важной деталью являлась пробоподготовка по совершенно современному, быстрому и эффективному методу QuEChERS [13], вследствие чего была проведена валидация данного метода в совокупности с газохроматографическим анали-

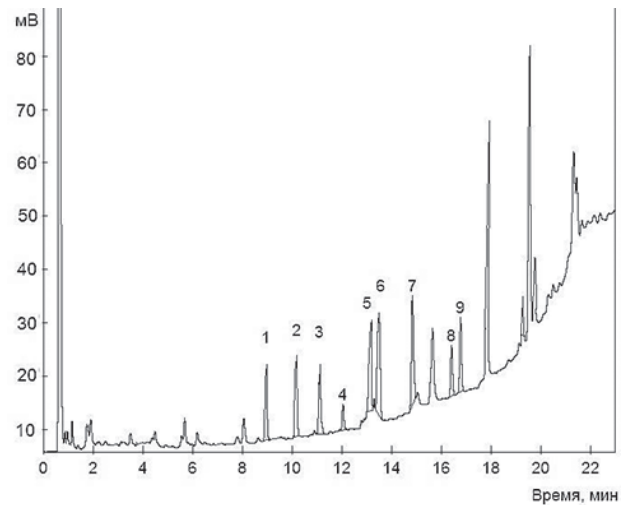


Рис. 5. Хроматограмма чистого образца пчелиного подмора с содержанием пестицидов на уровне предела количественного определения

зом, что характеризует пригодность данного способа для анализа пестицидов разного класса в одной биологической матрице.

Проведенная валидация и адаптация метода определения хлор- и фосфорорганических пестицидов методом газовой хроматографии в биоматериале пчелиного подмора является внутрилабораторной научно-исследовательской работой. Представленные данные отражают характерные результаты исследований, а приведенные рекомендации по хроматографическому анализу могут быть использованы другими лабораториями в качестве вспомогательного информационного материала. Таким образом, данный материал может быть дополнен анализом других хлор- и фосфорорганических пестицидов с соответствующими расчетами и валидацией методики определения.

Заключение

В результате работы была проведена валидация и приработка метода QuEChERS на возможность определения хлорорганических и фосфорорганических пестицидов в пчелином подморе методом газовой хроматографии с применением детектора по захвату электронов (ЭЗД). Получены соответствующие валидационные показатели по специфичности, линейности, правильности и прецизионности, а также по пределу количественного определения и степени извлечения определяемых компонентов при вы-

полнении всех операций пробоподготовки материала, характеризующие пригодность данного способа для анализа пестицидов разного класса в одной биологической матрице – пчелиного подмора.

Представленные в работе данные по определению пестицидов в пробе пчелиного подмора методом QuEChERS отражают характерные результаты. Работа подготовлена на основании материалов, полученных в ходе внутренней валидации разработанного метода определения пестицидов.

Список литературы

1. Буренин Н. Л. Охрана пчел от отравления пестицидами. / Н. Л. Буренин, Г. Н. Котова. // Справочник по пчеловодству. М.: Агропромиздат, 1985. С. 158–161.
2. Вашков В. И. ДДТ и его применение. / В. И. Вашков, Л. Н. Погодина, Н. А. Сазонова. М.: Медгиз, 1955.
3. Вашков В. И. Содержание ДДТ в организме животных и методы его определения. / В. И. Вашков, Н. А. Сазонова. // Труды центрального научно-исследовательского дезинфекционного института. Вып. 7, 1951.
4. Ветеринарно-санитарный паспорт пасеки. Утв. ДВ МСХ и продовольствия РФ 30.08.98 г.
5. Назаров Г. С. ДДТ и Гексахлоран в ветеринарии. Механизм действия ДДТ на организм насекомых. / Г. С. Назаров М.: Сельхозгиз, 1959. С. 44–50.
6. Назаров С. С. Охрана пчел от отравления ядохимикатами. / С. С. Назаров. М.: Изд-во Минпромзага, 1963. 184 с.
7. Прокофьева Л. В. Определение экономического ущерба от отравления и зимней гибели пчелиных семей. Научно-методическое издание. / Л. В. Прокофьева,

Л. Ф. Соловьева. Рыбное: ГНУ НИИ пчеловодства, Россельхозакадемия, 2010. 19 с.

8. Соловьева Л. Ф. Инструкция по профилактике отравления пчел пестицидами. / Л. Ф. Соловьева. М.: ГАП СССР, Агропромиздат, 1989. 8 с.

9. Соловьева Л. Ф. Пестициды и пчелы / Л. Ф. Соловьева. // Защита и карантин растений. 2004. № 5. С. 54–55.

10. Соловьева Л. Ф. Химический токсикоз медоносных пчел: профилактика, диагностика и лечение. / Л. Ф. Соловьева. // Сборник научно-исследовательских работ по пчеловодству. Рыбное: НИИП, 2005. С. 194–208.

11. Соловьева Л. Ф. Токсикозы медоносных пчел. / Л. Ф. Соловьева, С. Я. Годяцкий. М., 1995.

12. Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. 2007 год. «Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации». М., 2007.

13. Anastassiades M. Fast and Easy Multiresidue Method Employment Acetonitrile Extraction/Partitioning and «Dispersive Solid-Phase Extraction» for the Determination of Pesticide Residues in Produce. / Anastassiades M., Lehotay S. J. // Journal AOAC Int., 2003, 86. P. 412–431.

14. Fritch H. Versuche zum Analyse des Angriffspunktes kontakt insektizider Stoffe. / Fritch H. // Biol. Zentralblatt, 1952. V. 71. N 9/10. S. 512–528.

15. Hamide Z. Senyuva. A Simple Users Guide to Method Development and Validation. / Hamide Z. Senyuva, John Gilbert. // Method validation, John Gilbert., 2011. P. 43.

16. Hoffmann J. Zur Wirkungsweise neuer insekticides Stoffe. / Hoffmann J., Lendle Z. // Arch. Exp. Path., 1948. V. 205. S. 223.

17. Welch J. The mode of action of certain insecticides on the arthropod nervaxon. / Welch J., Gordon H. // J. Cellular Comp. Physiol., 1949, V. 30. P. 147.

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 2019 г. согласно инф. письму б/н от 03.09.18 г. НДС не облагается. Адрес подписки: ..."

Стоимость редакционной подписки на 2019 год 2000 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

DOI: 10.24411/2074-5036-2019-10042

УДК 576.08

Ключевые слова: абсансная эпилепсия, миндалевидный комплекс, астроциты, глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP)

Keywords: absence epilepsy, amygdala, astrocytes, glial fibrillary acidic protein (GFAP).

Денисова В. В., Файрушина А. И., Хисматуллина З. Р., Садрtdинова И. И.

**ВЛИЯНИЕ ДЕФИЦИТА ТЕСТОСТЕРОНА НА МОРФОЛОГИЮ
И КОЛИЧЕСТВО АСТРОЦИТОВ МИНДАЛЕВИДНОГО КОМПЛЕКСА
МОЗГА КРЫС С АБСАНС-ЭПИЛЕПСИЕЙ**

*THE EFFECT OF TESTOSTERONE DEFICIENCY ON THE MORPHOLOGY AND QUANTITY
OF ASTROCYTES OF THE BRAIN'S AMYGDALA OF RATS WITH ABSENCE EPILEPSY*

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет»

Адрес: 450076, Россия, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32

Bashkir State University

Address: 450076, Russia, Ufa, Zaki Validi St., 32

Денисова Вероника Владимировна, магистрант биологического факультета кафедры физиологии и общей биологии. E-mail: veronika.denisova.2015@mail.ru

Denisova Veronika Vladimirovna, master student of the Faculty of Biology, Department of Physiology and General Biology. E-mail: veronika.denisova.2015@mail.ru

Файрушина Аделия Ильдаровна, магистрант биологического факультета кафедры физиологии и общей биологии. E-mail: fayrushina96@mail.ru

Fayrushina Adelia Ildarovna, master student of the Faculty of Biology, Department of Physiology and General Biology. E-mail: fayrushina96@mail.ru

Хисматуллина Зухра Рашидовна, д. б. н., проф., зав. кафедрой физиологии и общей биологии. E-mail: hismatullinazr@mail.ru

Khismatullina Zuhra Rashidovna, Doctor of Biological Sciences, professor, Head of Department of Physiology and General Biology. E-mail: hismatullinazr@mail.ru

Садрtdинова Индира Ильдаровна, к. б. н., доцент кафедры физиологии и общей биологии. E-mail: indira.ildarovna@mail.ru

Sadrtdinova Indira Ildarovna, PhD of Biological Sciences, assistant professor of Department of Physiology and General Biology. E-mail: indira.ildarovna@mail.ru

Аннотация. Эпилепсия – одно из наиболее широко распространенных неврологических заболеваний населения. Несмотря на многочисленные исследования, механизмы возникновения данной патологии недостаточно изучены. Целью работы стало изучение морфофункционального состояния астроцитов переднего кортикального ядра миндалевидного комплекса мозга при дефиците тестостерона при неконвульсивной (абсансной) форме эпилепсии. В экспериментальном исследовании на лабораторных животных – самцах крыс линии WAG/Rij, являющихся признанной моделью абсансной эпилепсии, продемонстрировано влияние дефицита тестостерона на астроцитарную глию. Исследование проведено с использованием современного метода окрашивания клеток – иммуногистохимии, которым выявляли содержание маркера астроглиальных клеток – кислого глиального фибриллярного белка (GFAP). Выявлена реактивность астроцитов, которая выражалась в изменении морфологических и морфометрических параметров. Измерение морфометрических характеристик показало, что после экспериментальной орхидэктомии происходит увеличение размеров клеток. Подсчет количества астроцитов демонстрирует их явную пролиферацию в ответ на понижение уровня половых гормонов в группе орхидэктомированных животных.

Summary. Epilepsy is one of the most widespread neurological diseases of population. Despite numerous studies, the mechanisms of occurrence of this pathology are not enough understood. The purpose of the work was to study the changes in the morphofunctional state of the astrocytes of the anterior cortical nucleus of the brain's amygdala in response to testosterone deficiency at nonconvulsive (absence) form of epilepsy. In an experimental study on laboratory animals – male WAG / Rij rats, which is a recognized model of human absence epilepsy, the effect of testosterone deficiency on astrocytes was demonstrated. The study was conducted using the modern cell staining method – immunohistochemistry. Using an immunohistochemical method, we detected the content of the marker of astroglial cells – a glial fibrillary acidic protein (GFAP). Reactivity of astrocytes was revealed, and it was expressed in changes of morphological and morphometric parameters. Measurement of morphometric characteristics showed that after experimental orchidectomy there is an increase in cell sizes. Counting the number of astrocytes demonstrates their apparent proliferation in response to a decrease of the level of sex hormones in the group of orchidectomized animals.

Введение

Эпилепсия является хронической нейрогенной патологией, которая обычно спровоцирована нарушениями в центральной нервной системе (ЦНС). В иерархии общих и неврологических заболеваний эпилепсия занимает третье место [1, 5, 13]. Известно об эндокринологическом участии в регуляции возникновения абсансных эпилептических приступов [8].

Миндалевидный комплекс (МК) мозга обладает низким порогом чувствительности к судорожной активности [7]. Он участвует в ключевых механизмах регуляции широкого спектра физиологических процессов, а также играет ведущую роль в регуляции нейроэндокринных процессов и поведения [2, 3, 4]. Как нейроэндокринный центр, выполняя регуляцию секреции гонадотропинов и участвуя в организации полового поведения, МК контролирует половое созревание организмов и взаимодействует с гипоталамической областью мозга [4, 14, 15].

Переднее кортикальное ядро (СОа) миндалевидного комплекса мозга является элементом нейроэндокринной системы мозга, так как нейроны СОа имеют рецепторы к половым стероидам и реагируют на их уровень изменением своей функциональной активности [2, 4]. В ранее проведенных электрофизиологических исследованиях было выявлено, что СОа является областью мозга, в которой регистрировались пик-волновые разряды (SWD), характерные для абсанс-эпилепсии [10].

Всё вышеизложенное объясняет повышенный интерес к изучению изменений морфофункциональных характеристик астроцитов СОа МК мозга при абсансной эпилепсии, которые обусловлены влиянием на них половых гормонов.

Материалы и методы. Исследование было проведено на половозрелых самцах крыс линии WAG/Rij (n=24) с массой тела 250–300 г, в возрасте шести месяцев, являющихся инбредной линией с абсансной эпилепсией. Крысы были разделены на две группы: контрольную и группу орхидэктомированных животных. Животные были выращены в стандартных условиях вивария кафедры

физиологии и общей биологии БашГУ, характеризующихся постоянством комнатной температуры (20°–22°C) и уровнем влажности.

С целью моделирования дефицита половых гормонов была проведена орхидэктомия самцов [4]. После операции крыс помещали в чистую клетку и содержали при обычных условиях. Через месяц были произведены декапитация животных и извлечение головного мозга для изготовления микропрепаратов исследуемой нами структуры МК. В течение всего эксперимента контрольных и опытных животных содержали без стрессовых и медикаментозных воздействий. Работа с экспериментальными животными, а также выведение их из эксперимента проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ СССР от 12.08.1977 № 755).

Образцы фиксировались в 10 % забуференном формалине, далее заливались в парафиновые блоки по общепринятой методике. Изготовление серийных срезов во фронтальной плоскости толщиной 4 мкм проводилось на микротоме Leica RM 2145 (Германия).

Далее срезы окрашивали с помощью иммуногистостейнера Leica Microsystems BOND-TM (Германия). Иммуногистохимическим методом выявляли содержание маркера глиальных клеток – высокоспецифичного кислого глиального фибриллярного белка (GFAP) на парафиновых срезах согласно протоколу, указанному производителем: использовали мышинные моноклональные антитела (Santa Cruz Biotechnology) и универсальную систему вторичной детекции для визуализации (NovocastraTM). Исследовали СОа МК мозга крыс линии WAG/Rij до и после орхидэктомии. После проведения иммуногистохимической реакции ядра клеток докрашивались гематоксилином.

Оценку структурных изменений астроцитов проводили с помощью микроскопа МИКМЕД-5 (ЛОМО) и камеры Levenhuk C510 при увеличении x400. С помощью специализированного программного обеспечения PhotoM и TourView производились измерение площади и подсчёт клеток глии.

Математико-статистическую обработку данных проводили с помощью программы «STATISTICA» v.10.0 (Stat Soft Inc., США). Для оценки различий в независимых группах использовался непараметрический критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U test). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

В ходе иммуногистохимического исследования было отмечено, что астроциты СОа МК головного мозга крыс реагируют на изменение уровня половых гормонов. На гистологических препаратах было выявлено изменение степени экспрессии GFAP в СОа МК мозга крыс линии WAG/Rij до и после орхидэктомии (рис. 1–2).

На контрольных препаратах выявлялись астроциты различной полигональной формы: звездчатые, веретеновидные, пирамидообразные и т.д. (рис. 1).

Контуры астроцитов определялись четко, количество отростков незначительное. GFAP умеренно экспрессировался в телах и отростках астроцитов. Клетки можно охарактеризовать как гипохромные, с хорошо определяющимися ядрами, имеющими центральное положение.

После орхидэктомии (рис. 2) клетки астроглии в экспериментальной группе характеризовались как гиперхромные, клеточные ядра

плохо визуализировались. Определяется густая сеть толстых древовидных отростков астроцитов, происходит резкое повышение уровня GFAP. Форма астроцитов стала исключительно звездчатой. Нечеткость и расплывчатость границ клеток объясняется их гипертрофией – ответной реакцией на повреждение, проявляющейся признаками цитотоксического отека, повреждающего белки промежуточных филаментов в телах и отростках.

Наши результаты коррелируют с литературными данными, в которых астроциты в ответ на выраженное ограничение кровотока в головном мозге иммунопозитивно реагировали на GFAP [6; 19], что объясняется их повышенной активностью.

Следующим этапом после визуального анализа морфологической картины стало проведение морфометрического анализа астроцитов на микрофотографиях (табл. 1).

Результаты измерения морфометрических параметров показали, что экспериментально вызванный дефицит половых стероидов стимулирует увеличение размеров клеток на 37,43 % по сравнению с интактной группой.

Подсчет количества астроцитов демонстрирует их явную пролиферацию в ответ на понижение уровня половых гормонов: количество клеток увеличилось на 57,32 %.

Таким образом, уровень функциональной активности астроцитов определяется их

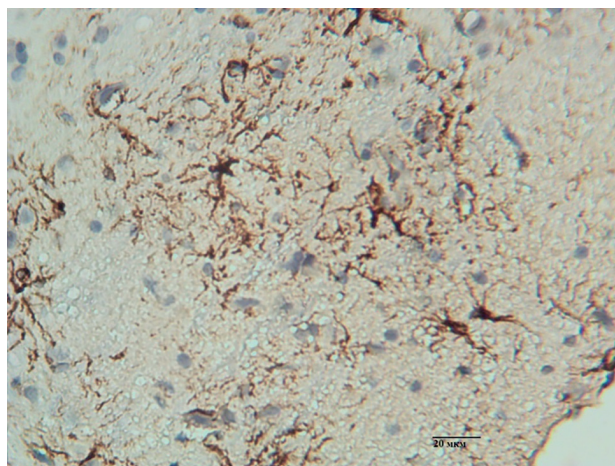


Рис. 1. Экспрессия кислого глиального фибриллярного белка (коричневый цвет) в СОа МК мозга крыс линии WAG/Rij в контрольной группе. Непрямой иммунопероксидазный метод с подкраской гематоксилином. Ув. x400.

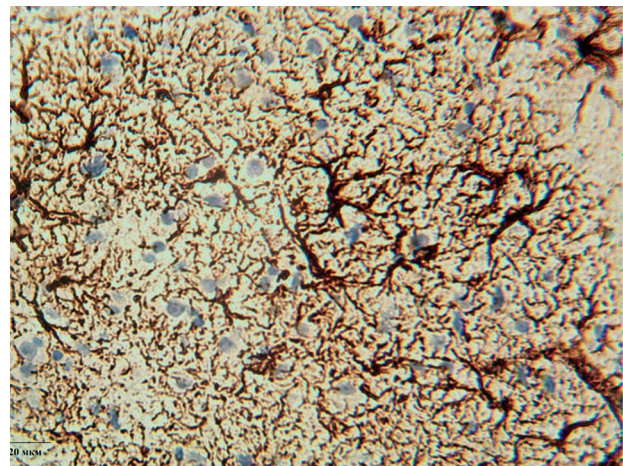


Рис. 2. Экспрессия кислого глиального фибриллярного белка (коричневый цвет) в СОа МК мозга крыс линии WAG/Rij после орхидэктомии. Непрямой иммунопероксидазный метод с подкраской гематоксилином. Ув. x400.

Динамика площади и числовых показателей астроцитов в переднем кортикальном ядре МК мозга при дефиците тестостерона у самцов крыс (M±m)

Исследуемый параметр	Контроль	Орхидэктомия	Достоверность различий
Площадь астроцитов, мкм ²	380,68±15,84	523,17±20,03	p<0,05
Количество астроцитов	15,37±0,92	24,18 ±1,26	p<0,05

морфологическими и численными изменениями, которые зависят от их окружения, так как они меняют свою форму на звездчатую только при активном контакте с соседними клетками.

Морфоструктурные параметры могут быть использованы в качестве критериев при исследовании нейропатологических процессов [9, 11, 12]. Влияние дефицита андрогенов, являющегося травматичным фактором для нервной системы, на морфофункциональное состояние астроцитов проявляется астроцитарной реакцией: гипертрофией и гиперплазией клеток, в связи с чем увеличивается число синаптических контактов, из-за чего астроциты приобретают форму звезды с большим числом крупных отростков. Такая реакция астроцитов на изменение уровня половых гормонов подтверждает данные об их влиянии на морфологию структур головного мозга [4, 14, 15].

Список литературы

1. Авакян Г. Н. Репродуктивные нарушения у мужчин с эпилепсией / Г. Н. Авакян, О. Л. Бадалян, Е. В. Крикова, А. С. Чуканова, С. Г. Бурд // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2010. №1. С. 30–36.
2. Ахмадеев А. В. Нейробиологические основы девиантного поведения при алкоголизме / А. В. Ахмадеев, Л. Б. Калимуллина // Вестник Башкирского государственного университета. 2015. № 2.
3. Ахмадеев А. В. Нейроэндокринная регуляция функций миндалевидного тела мозга: роль половых стероидов и норадреналина / А. В. Ахмадеев, Л. Б. Калимуллина // Морфология. 2010. № 5. С. 73–77.
4. Бабичев В. Н. Нейроэндокринный эффект половых гормонов / В. Н. Бабичев // Успехи физиологических наук. 2005. №1. С. 54–67.

5. Блинов Д. В. Общность ряда нейробиологических процессов при расстройствах деятельности ЦНС / Д. В. Блинов // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2011. № 2. С. 28–33.

6. Воронков Д. Н. Иммуноцитохимические и морфометрические изменения астроглии в перифокальной зоне моделируемого инфаркта миокарда мозга / Д. Н. Воронков, О. В. Сальникова, Р. М. Худоерков // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2017. № 1. С. 40–46.

7. Ильюченко Р. Ю. Миндалевидный комплекс (связи, поведение, память). / Р. Ю. Ильюченко. Новосибирск: Наука, 1981.

8. Кабак Я. М. Практикум по эндокринологии. / Я. М. Кабак. М.: Изд-во МГУ, 1968.

9. Наумов Н. Г. Реактивные изменения нейронов и астроцитов прилежащего ядра головного мозга после ограничения кровотока у крыс / Н. Г. Наумов, А. В. Дробленков // Вестник Новгородского государственного университета. 2016. № 6. С. 143–147.

10. Садртдинова И. И. Стероидная регуляция нейронной возбудимости в переднем кортикальном ядре миндалевидного комплекса мозга у крыс линии WAG/Rij / И. И. Садртдинова, З. Р. Хисматуллина // Биомедицина. 2014. № 2. С. 64–72.

11. Резников А. Г. Половые гормоны и дифференциация мозга. / А. Г. Резников. Киев: Наук. думка, 1982.

12. Рыжавский Б. Я. Развитие головного мозга: отдаленные последствия влияния некомфортных условий. / Б. Я. Рыжавский. Хабаровск: Изд-во ДВГМУ, 2009.

13. Толмачева Е. А. Роль половых стероидов в регуляции спайк-волновой активности у крыс линии WAG/Rij. Автореф. ... дис. канд. биол. наук. / Е. А. Толмачева. М., 2006.

14. Montouris G. Reproductive and sexual dysfunction in men with epilepsy / Montouris G., Morris G. // Epilepsy & Behavior. 2005. № 7. P. 7–14.

15. Wang Q. The roles of estrogen and progesterone in epileptogenesis and their mechanisms of action / Wang Q. // Sheng Li KeXueJin Zhan. 2000. № 3. P. 231–233.

Подписной индекс журнала
«Актуальные вопросы ветеринарной биологии»:
Агентство «Роспечать» – 33184

DOI: 10.24411/2074-5036-2019-10043

УДК 619:616-091:636.4

Ключевые слова: свиньи, откорм, лавсониоз, патоморфология

Keywords: pigs, fattening, lawsoniosis, pathomorphology

Балабанова В. И., Кудряшов А. А.

**ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ЛАВСОНИОЗЕ
У ОТКОРМОЧНЫХ СВИНЕЙ**
PATHOMORPHOLOGICAL CHANGES IN LAWSONIOSIS FROM FATTENING PIGS

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»

Адрес: 196084, Россия, Санкт-Петербург, Черниговская ул., 5

*Saint-Petersburg State Academy of Veterinary Medicine**Address: 196084, Russia, Saint-Petersburg, Chernigovskaya Str., 5.*

Балабанова Виктория Игоревна, к. в. н., доц., доцент кафедры патологической анатомии и судебной ветеринарной медицины. E-mail: patan2017@outlook.com. Тел.: +78123881378

Balabanova Victoria Igorevna, PhD of Veterinary Sciences, Associate Professor of the Pathologic Anatomy and Legal Veterinary Medicine Department. E-mail: patan2017@outlook.com. Tel.: +78123881378

Кудряшов Анатолий Алексеевич, д. в. н., проф., зав. кафедрой патологической анатомии и судебной ветеринарной медицины. E-mail: patan2017@outlook.com. Тел.: +78123881378

Kudriashov Anatoly Alekseevich, Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Head of the Pathologic Anatomy and Legal Veterinary Medicine Department. E-mail: patan2017@outlook.com. Tel. +78123881378

Аннотация. Цель работы – установить типичные патоморфологические изменения у откормочных свиней при лавсонииозе для усовершенствования патологоанатомической и дифференциальной диагностики. Объектом и материалом исследования послужили 9 свиней в возрасте 160–170 дней из группы откорма промышленного свиного комплекса, образцы сыворотки крови которых признаны положительными при определении антител к возбудителю лавсонииоза *Lawsonia intracellularis* методом ИФА, набор BioScreen Ileitis Ab ELISA. Совместно со специалистами фермы проведено патологоанатомическое исследование этих свиней и затем гистологическое исследование подвздошной кишки. В результате патологоанатомического исследования у 3-х свиней обнаружено пролиферативное воспаление подвздошной кишки, включая илео-цекальный клапан, и у 6 – пролиферативно-геморрагическое воспаление подвздошной, тощей, слепой и ободочной кишок. При патогистологическом исследовании в слизистой оболочке подвздошной кишки выявили атрофию ворсинок с полным отсутствием их на отдельных участках. Ворсинки покрыты крупными, слабо дифференцированными клетками; отсутствуют бокаловидные клетки; крипты сильно расширены и удлинены, многие выдаются в подслизистый слой и кишечечно-ассоциированную лимфоидную ткань; в криптах находятся скопления крупных, слабо дифференцированных железистых клеток (аденоматоз), выделяются клетки с сильно окрашенным ядром и базофильной цитоплазмой. В слизистой оболочке подвздошной кишки у 6 свиней при пролиферативно-геморрагической энтеропатии, наряду с аденоматозом, обнаружили лейкоцитарную инфильтрацию собственной пластинки, тромбоз мелких кровеносных сосудов, скопления нейтрофильных лейкоцитов в полости крипт, очаги некроза и кровоизлияния в слизистой оболочке. Пролиферативное воспаление подвздошной кишки, включая илео-цекальный клапан, следует считать патогномоничным для лавсонииоза откормочных свиней. Это позволяет при дифференциальной диагностике отличать лавсонииоз от болезней, сходных с лавсонииозом по клиническим признакам.

Summary. The aim of this work is to establish typical pathomorphological changes in fattening pigs in lawsoniosis to improve the pathology and differential diagnosis. The object and the material of the study consists of 9 pigs at the age of 160–170 days from the fattening group of an industrial pig farm, serum samples of blood which were considered positive after detection of antibodies to the causative agent of *Lawsonia intracellularis* lawsoniosis by ELISA, the set of BioScreen Ileitis Ab ELISA. Together with the specialists of the farm, a pathoanatomical study of these pigs and a histological study of the ileum were conducted. As a result of the pathoanatomical study in 3 pigs proliferative inflammation of the ileum was found, including the ileo-cecal valve, and in 6 pigs – proliferative-hemorrhagic inflammation of the ileum, jejunum, cecum and colon. Pathohistological study in the mucous membrane of the ileum revealed atrophy of the villi with a complete absence of them in some areas. The villi are covered with large, poorly differentiated cells; there are no goblet cells; crypts are greatly expanded and elongated, many are issued in the submucosal layer and intestinal-associated lymphoid tissue; in the crypts there are clusters of large poorly differentiated glandular cells (adenomatosis) and cells are allocated with a strongly colored nucleus and basophilic cytoplasm. In the mucous membrane of the ileum in 6 pigs with proliferative-hemorrhagic enteropathy, along with adenomatosis, leukocyte infiltration of their own plate, thrombosis of small blood vessels, clusters of neutrophils in the cavity of crypts, foci of necrosis and hemorrhage in the mucous membrane were found. Proliferative inflammation of the ileum, including ileo-cecal valve, should be considered pathognomonic for lawsoniosis of pigs, which allows for differential diagnosis to distinguish lawsoniosis from diseases similar to lawsoniosis by clinical signs.

Введение

Лавсониоз – болезнь свиней, вызываемая бактерией *Lawsonia intracellularis*. К настоящему времени лавсониоз свиней распространился в хозяйствах многих стран мира [1, 2, 3, 9, 5]. Болеют лавсонизом животные разного возраста, начиная с 3-х недель, чаще же всего – откормочные свиньи. Свинофермы с заражённым поголовьем несут значительные убытки из-за недополучения продукции в связи с неэффективным откормом. Болезнь проявляется в виде пролиферативного воспаления кишечника. В прошлые годы причиной выше названной кишечной болезни свиней считались бактерии рода *Campylobacter* – *C. mucosalis* и *C. intestinalis* [4]. В 1995 году был открыт истинный возбудитель болезни – бактерия *Lawsonia intracellularis* [6]. Патогенез лавсониоза считается недостаточно изученным. Считают, что после алиментарного заражения лавсония попадает в кишечные крипты и размножается главным образом в подвздошной кишке, в делящихся клетках крипт, являясь внутриклеточным «паразитом». Наличие разных видов изменения кишечника при лавсониозе, а именно кишечного аденоматоза, некротического энтерита, регионального илеита, геморрагической энтеропатии, пролиферативной энтеропатии, связывают с соотношением резистентности животного, в частности, зависящей от возраста, и вирулентности бактерии [8]. Преобладание пролиферации (аденоматоза), или альтерации (некроза, повреждения кровеносных сосудов) при лавсониозе теоретически возможно у животных любого возраста. Мы исследовали откормочных свиней, поскольку изначально были заинтересованы изучить патоморфологию болезней свиней этой группы. В клиническом проявлении лавсониоза отмечают диарею, нередко с кровянистыми фекалиями, отставание в росте, плохие кондиции [4]. В клиническом проявлении лавсониоз имеет сходство с дизентерией, сальмонеллёзом, колибактериозом, балантидиозом, трихоцефалёзом. Для его дифференциации используют прижизненное исследование методом ИФА. Однако при обнаружении антител необходимо учитывать возможность латентного течения заболевания и бактерио-

носительства. В таком случае целесообразно провести вскрытие и гистологическое исследование и найти патологоанатомические и патогистологические изменения, свойственные лавсониозу. Поэтому определена цель данной работы: установить типичные патоморфологические изменения у откормочных свиней при лавсониозе для усовершенствования патологоанатомической и дифференциальной диагностики.

Материалы и методы исследования

Объектом и материалом исследования послужили 9 свиней в возрасте 160–170 дней из группы откорма промышленного свиного комплекса, образцы сыворотки крови которых признаны положительными по лавсониозу. Для определения антител к возбудителю лавсониоза *Lawsonia intracellularis* применён метод ИФА с использованием набора BioScreen Ileitis Ab ELISA. Совместно со специалистами фермы проведено патологоанатомическое исследование этих свиней. Отобрали пробы подвздошной кишки для гистологического исследования. Патологический материал фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина. Затем проводили заливку в парафин по общепринятой методике и на ротационном микротоме изготовили срезы толщиной 5–7 мкм. Срезы окрасили гематоксилином и эозином. Изучение гистологических препаратов провели при помощи светоптического микроскопа для биологических исследований N-100В при увеличении 160 и 600. Микрофотографирование проводили при помощи цифровой камеры Levenhuk C510.

Результаты исследования

Результаты серологического исследования
В результате исследования методом ИФА с использованием набора BioScreen Ileitis Ab ELISA образцы сыворотки крови признаны положительными по лавсониозу.

Результаты патологоанатомического исследования

У всех свиней при вскрытии установили патологоанатомические изменения в кишечнике, однако, не одного, а двух видов. У 3-х свиней обнаружили макроскопические изме-

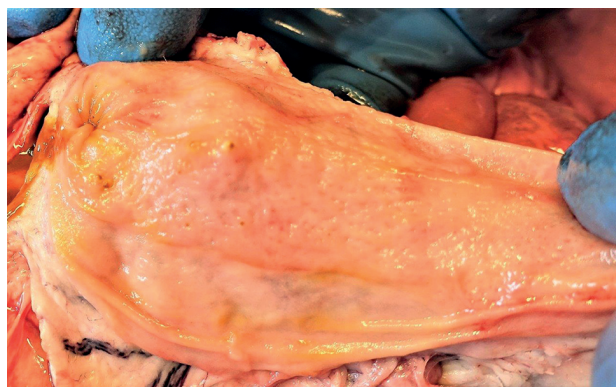


Рис. 1. Конечная часть подвздошной кишки в относительной норме. Видны устья крипт в широкой пейеровой бляшке. Отдельные крипты воспалены



Рис. 2. Лавсониоз. Проллиферативный илеит



Рис. 3. Лавсониоз. Проллиферативный илеит (фиксированный материал)

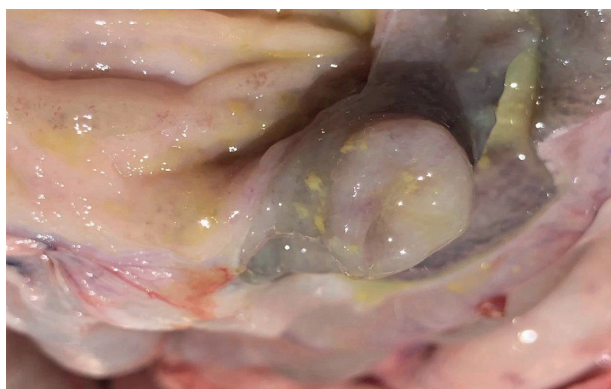


Рис. 4. Илео-цекальный клапан в норме



Рис. 5. Лавсониоз. Илео-цекальный клапан. Проллиферативное воспаление



Рис. 6. Лавсониоз. Илео-цекальный клапан. Проллиферативное воспаление (фиксированный материал)



Рис. 7. Лавсониоз. Проллиферативно-геморрагическое воспаление подвздошной кишки



Рис. 8. Лавсониоз. Проллиферативно-геморрагическое воспаление тощей кишки

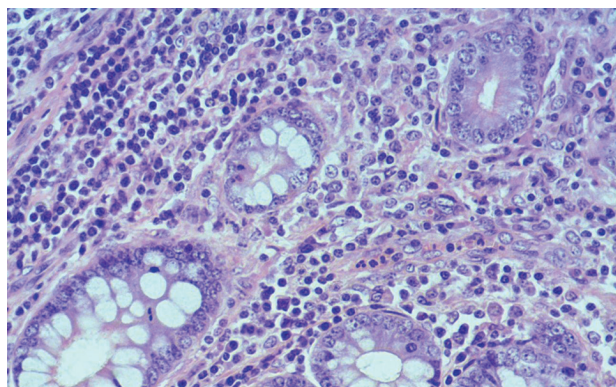


Рис. 9. Подвздошная кишка. Крипты. Норма. Окр. гематоксилин-эозин. Ув. 150

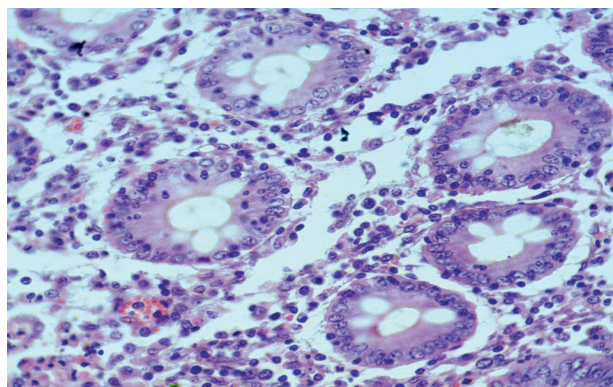


Рис. 10. Илео-цекальный клапан. Крипты. Норма. Окр. гематоксилин-эозин. Ув. 150

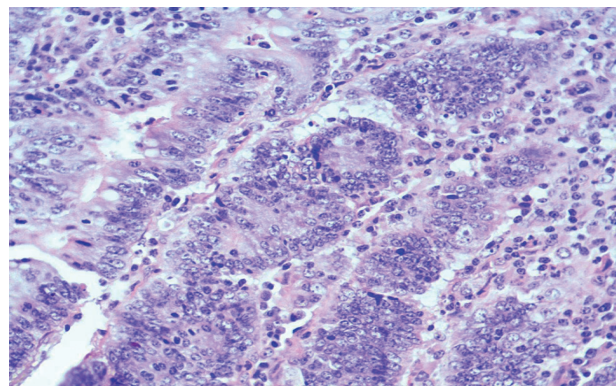


Рис. 11. Лавсониоз. Подвздошная кишка. Крипты. Аденоматоз. Окр. гематоксилин-эозин. Ув. 600

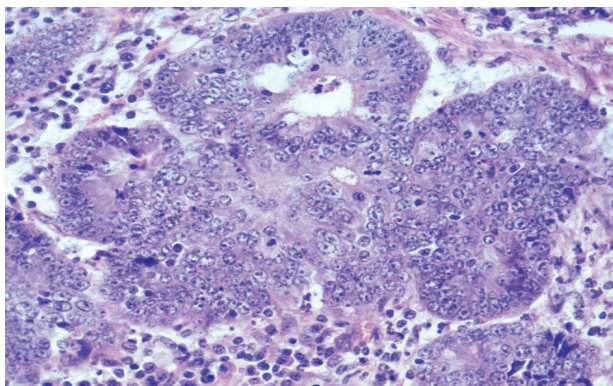


Рис. 12. Лавсониоз. Илео-цекальный клапан. Крипты. Аденоматоз. Окр. гематоксилин-эозин. Ув. 600

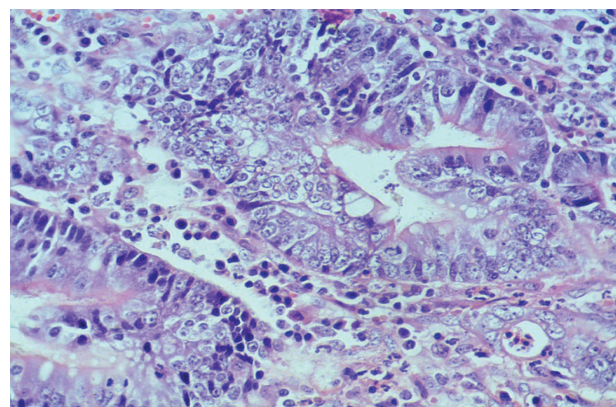


Рис. 13. Лавсониоз. Подвздошная кишка. Крипты. Базофилия клеток, инфицированных лавсонией, и аденоматоз. Окр. гематоксилин-эозин. Ув. 600

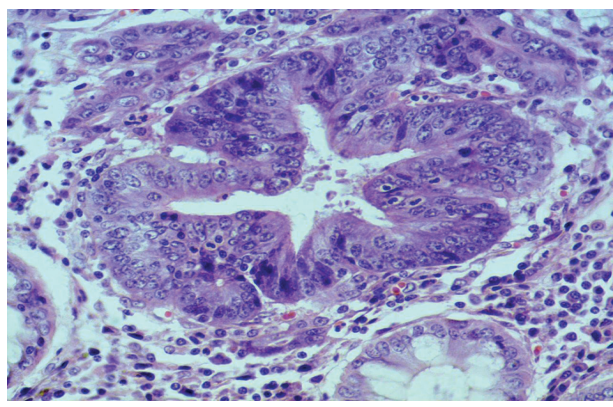


Рис. 14. Лавсониоз. Илео-цекальный клапан. Крипты. Базофилия клеток, инфицированных лавсонией, и аденоматоз. Окр. гематоксилин-эозин. Ув. 600

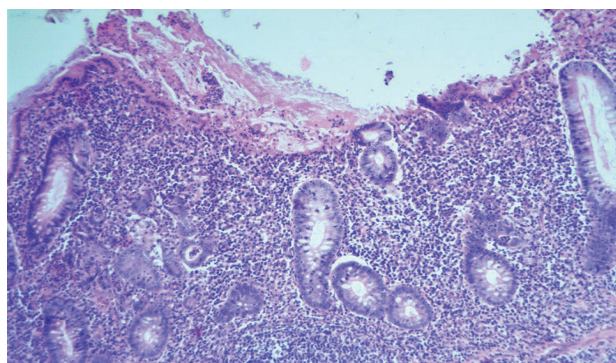


Рис. 15. Лавсониоз. Илео-цекальный клапан. Некроз слизистой оболочки 1. Окр. гематоксилин-эозин. Ув. 160

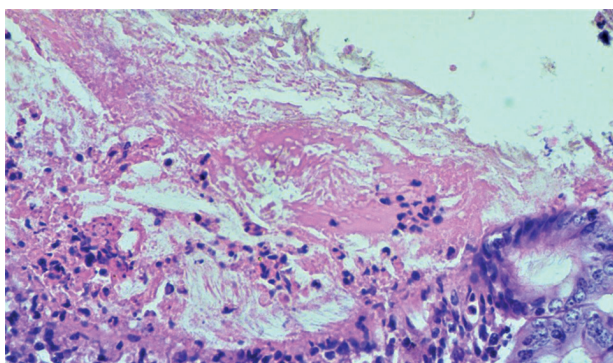


Рис. 16. Лавсониоз. Илео-цекальный клапан. Некроз слизистой оболочки 2. Окр. гематоксилин-эозин. Ув. 600

нения только в подвздошной кишке. Стенка кишки сильно утолщена, уплотнена; слизистая оболочка – светло-серого цвета, собрана в крупные и мелкие складки (рис. 2, 3). Складки не удаётся расправить. Такие патологоанатомические изменения описаны при пролиферативной энтеропатии свиней, одной из форм лавсонииза [7]. Нерасправленные складки найдены также на илеоцекальном клапане – анатомическом образовании, которое разделяет полости тонкой и толстой кишок (рис. 5–6). Описание складок на илео-цекальном клапане при лавсониизе нам не удалось найти в доступных источниках информации. У 6 других свиней обнаружили макроскопические изменения в подвздошной, тощей, слепой и ободочной кишках. Слизистая оболочка кишок немного утолщена, складчатая, тёмно-красного цвета, содержит мелкие эрозии. На поверхности слизистой оболочки и в просвете кишок находится жидкое кровянистое содержимое, а также свёртки крови и фибрина в виде длинных «жгутов» (рис. 7, 8). В источниках информации подобные патологоанатомические изменения относят к другой форме лавсонииза – пролиферативно-геморрагической энтеропатии [8]. У выше названных 6 свиней наряду с изменениями в кишечнике отметили анемию кожи, мышц, паренхиматозных органов.

Результаты гистологического исследования

В слизистой оболочке подвздошной кишки 3-х свиней с пролиферативной энтеропатией ворсинки атрофированы, на отдельных участках отсутствуют. В некоторых ворсинках находятся единичные бокаловидные клетки, кишечные ворсинки покрыты крупными, слабо дифференцированными клетками. Такие клетки в большом числе находятся в нижней части ворсинок и заполняют полости крипт. Крипты сильно расширены и удлинены, многие выдаются в подслизистый слой и кишечно-ассоциированную лимфоидную ткань. В криптах находятся скопления крупных слабо дифференцированных железистых клеток, то есть имеет место так называемый аденоматоз, являющийся результатом интенсивной пролифе-

рации клеток крипт (рис. 11, 12). В криптах выделяются клетки с сильно окрашенным ядром и базофильной цитоплазмой (рис. 13–14). Судя по литературным данным, определено [4], что в подобных клетках, только что образовавшихся при делении, идёт размножение лавсоний. В собственной пластинке слизистой оболочки находятся немногочисленные макрофаги. На отдельных участках в слизистой оболочке имеются очаги поверхностного некроза с инфильтрацией лейкоцитами в области границы некротического очага. На других участках найдены крипты со скоплением лейкоцитов в их полости. В слизистой оболочке подвздошной кишки у 6 свиней при пролиферативно-геморрагической энтеропатии наряду с аденоматозом, обнаружили лейкоцитарную инфильтрацию собственной пластинки, тромбоз мелких кровеносных сосудов, скопления нейтрофильных лейкоцитов в полости крипт, очаги некроза (рис. 15–16) и кровоизлияния в слизистой оболочке. Пролиферативное воспаление подвздошной кишки, включая илео-цекальный клапан, следует считать патогномичным для лавсонииза свиней, что позволяет при дифференциальной диагностике отличать лавсонииз от болезней, сходных с лавсониизом по клиническим признакам. При дизентерии, сальмонеллёзе, колибактериозе, балантидиозе, трихоцефалёзе развивается не пролиферативное, а экссудативное воспаление кишечника. При дизентерии, балантидиозе и трихоцефалёзе – катарально-геморрагическое воспаление, при колибактериозе – катаральное, при сальмонеллёзе – фибринозное. Видится целесообразным проведение патологоанатомического и патогистологического исследования подвздошной кишки свиней, чтобы иметь представление о наличии патоморфологических изменений, патогномичных для лавсонииза. Необходимо учитывать определённую недостаточность только лишь выявления генома возбудителя и антител к *Lawsonia intracellularis* у свиней на фермах. Известно, что на подобных фермах, где у свиней выявляют геном возбудителя и антитела к лавсонии, лавсонииз нередко протекает бессимптомно [5].

Заключение

В результате патологоанатомического исследования 9 откормочных свиней, признанных больными лавсониозом, обнаружено у 3-х – пролиферативное воспаление подвздошной кишки, включая илео-цекальный клапан, и у 6 – пролиферативно-геморрагическое воспаление подвздошной, тощей, слепой и ободочной кишок. При патогистологическом исследовании в слизистой оболочке подвздошной кишки выявили атрофию ворсинок с полным отсутствием их на отдельных участках. Ворсинки покрыты крупными, слабо дифференцированными клетками; отсутствуют бокаловидные клетки; крипты сильно расширены и удлинены, многие выдаются в подслизистый слой и кишечечно-ассоциированную лимфоидную ткань; в криптах находятся скопления крупных слабо дифференцированных железистых клеток (аденоматоз); выделяются клетки с сильно окрашенным ядром и базофильной цитоплазмой. В слизистой оболочке подвздошной кишки у 6 свиней при пролиферативно-геморрагической энтеропатии наряду с аденоматозом, обнаружили лейкоцитарную инфильтрацию собственной пластинки, тромбоз мелких кровеносных сосудов, скопления нейтрофильных лейкоцитов в полости крипт, очаги некроза и кровоизлияния в слизистой оболочке. Пролиферативное воспаление подвздошной кишки, включая илео-цекальный клапан, следует считать патогномичным для лавсониоза свиней, что позволяет при дифференциальной диагностике отличать лавсониоз от болезней, сходных с лавсониозом по клиническим признакам.

Список литературы

1. Кириллова О.С. Этиологическая роль *Lawsonia intracellularis* при пролиферативной энтеропатии свиней: диссертация на соискание учёной степени кандидата ветеринарных наук. / О.С. Кириллова. Омск: ФГБОУ ВПО Омский государственный аграрный университет имени П. А. Столыпина, 2016. 139 с.
2. Кукушкин С.А. Пролиферативная энтеропатия свиней (эпизоотология, диагностика, меры борьбы и профилактики). / С.А. Кукушкин // Ветеринария, 2010, № 8. С. 3–6.
3. Плешакова В.И. Серологический скрининг, клинико-эпизоотологические особенности, патоморфологические изменения при лавсониозе у свиней и его специфическая профилактика в хозяйствах Западной Сибири. / В.И. Плешакова, Л.И. Дроздова, О.С. Литая // Аграрный вестник Урала. 2013, № 6. С. 28–31.
4. Brown C., Baker D., Baker I. *Lawsonia intracellularis* infection / Brown C., Baker D., Baker I. // Jubb K., Kennedy P., Palmer N. Pathology of Domestic Animals. Fifth edition. Vol. 2. 2007. Elsevier, Philadelphia. P. 206–209.
5. Draskovic V. Influence of phytogetic feed additive on *Lawsonia intracellularis* infection in pigs. / Draskovic V., Bosnjak-Neumuller J., Vasiljevic M., Petrujkic B., Aleksic N., Kukol V., Stanimirovic Z. // Preventive Veterinary Medicine, 2018, 151. P. 46–51.
6. McOrist S. Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp. nov., the Obligately Intracellular Bacterium of Porcine Proliferative Enteropathy. / McOrist S., Gebhart C., Boid R., Barns S. // International Journal of Systematic Bacteriology, 1995, 45, 4. P. 820–825.
7. McOrist S. Porcine proliferative enteropathies. / McOrist S., Gebhart C. // B. Straw, W. Mengeling, S. Allaire, and D. Taylor, (eds.) Diseases of Swine, 8th ed, Iowa State University Press, Ames, IA, 1999. P. 521–534.
8. McOrist S. Proliferative enteropathy / McOrist S., Gebhart C.J. // Diseases of swine (edited by J.J. Zimmerman, L.A. Kariker, A. Ramires, K.J. Schwartz, G.W. Stevenson) 10th ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2012. P. 811–819.
9. Pascu C. Prevalence of *Lawsonia intracellularis* Infections in Pig Herds from the Western Romania. / Pascu C., Costinar L., Mernea I., Tătar D., Herman V. // Agriculture and Agricultural Science Procedia, 2015, 6. P. 378–381.

Подписной индекс журнала
«Актуальные вопросы ветеринарной биологии»:
Агентство «Роспечать» – **33184**

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 моно- или комплексной терапии целого ряда болезней, которые ранее считались неизлечимыми или очень тяжело поддавались лечению.



Основные направления применения «УМИ-05»

- Болезни мочевой системы: мочекаменная болезнь, пиелонефрит, поликистоз, цистит.
- Желчекаменная болезнь.
- Болезни 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 болезням 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

КРАТКАЯ ИНФОРМАЦИЯ О ЖУРНАЛЕ фундаментальных и прикладных исследований «Актуальные вопросы ветеринарной биологии»

1. Полная информация о журнале и архив номеров: http://invetbio.spb.ru/journal/vp_main.htm

2. Правила для авторов, подготовка материалов, оформление статьи, сопроводительное письмо: http://invetbio.spb.ru/journal/vb_avtor.htm (полная версия).

Важным условием для принятия материалов в журнал «Актуальные вопросы ветеринарной биологии» является их соответствие правилам журнала (см. полную версию). При наличии значительных отклонений от правил, направленные материалы рассматриваться не будут.

Материалы следует присылать по электронной почте: virclin@mail.ru. Электронный вариант статьи рассматривается как оригинал. **Сопроводительное письмо:** К материалам статьи необходимо приложить сопроводительное письмо на имя главного редактора журнала «Актуальные вопросы ветеринарной биологии» Чуваева И. В. Скачайте письмо, заполните его, распечатайте, подпишите у авторов и у руководителя организации/учреждения, поставьте круглую печать организации, отсканируйте письмо и вместе со статьей пришлите в редакцию.

Шаблон письма: <http://invetbio.spb.ru/journal/SoprovoPis.doc>

Задать вопрос о статусе статьи и пр. можно по электронной почте: virclin@mail.ru

3. Авторские права:

Авторы должны гарантировать, что поданные в журнал материалы не были ранее опубликованы. Авторы должны быть 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 могут являться:

- предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме;
- использование материалов статьи как части лекции или обзора;
- использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии.

4. Оплата за публикацию статей:

При соблюдении настоящих правил, рецензирование статьи и ее публикация является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях:

1. за публикацию цветных иллюстраций;
2. за большое количество иллюстративного материала (свыше 5-ти иллюстраций);
3. за размещение рекламной информации;
4. за повторную подачу материала в редакцию, в случае если статья (по результатам рецензирования) была отправлена автору на доработку;
5. за пользование платными услугами редакции.

Платные услуги, их стоимость и условия оплаты:

http://invetbio.spb.ru/journal/vb_platusluga.htm

5. Рецензирование статей:

Все материалы, поступающие в редакцию, для публикации в журнале, проходят рецензирование. Рецензирование осуществляется ведущими профильными специалистами (докторами и кандидатами наук).

6. Подписка и приобретение журнала или отдельных статей, в том числе электронных версий: http://invetbio.spb.ru/journal/vb_podpiska.htm

7. Информация для рекламодателей: http://invetbio.spb.ru/journal/vb_reklam.htm