Актуальные вопросы ветеринарной биологии № 2 (50) июнь 2021

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

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
Георгиев Б. А.
доцент, докт. вет. медицины
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
Равилов Р.Х.,
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
Суховей Д. А.

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

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВИРУСОЛОГИЯ

Орынбаев М.Б., Копеев С.К., Тулендибаев А.Б., Рыстаева Р.А., Султанкулова К.Т.
Восприимчивость сайгаков к нодулярному дерматиту при экпериментальном заражении 3

ПАРАЗИТОЛОГИЯ

Новоженова В.С., Янгирова Л.Я.
Сравнительный анализ зараженности кошек *Cystoisospora felis* и *Toxascaris leonina* 10

Слободяник Р.В., Зыкова С.С., Кряжев А.Л.
Эпизоотологические особенности дирофиляриоза в популяции безнадзорных собак Араратской области Республики Армения 12

ДИАГНОСТИКА

Доронин М.И., Михалишин Д.В., Мудрак Н.С.
Опосредованное определение инфекционного титра вируса бешенства в сырье для вакцин с применением транскрипционной амплификации и beacon-технологии 18

Доронин М.И., Михалишин Д.В., Борисов А.В., Мудрак Н.С., Михалишин В.В.
Опосредованный контроль полноты инактивации антигена вируса бешенства для антирабических вакцин с применением полимеразной цепной реакции 25

ТЕРАПИЯ

Ситчихина А.В.
Применение аутогемотерапии в комплексном лечении незаразной патологии молодняка крупного рогатого скота 35

ВЕТЕРИНАРНАЯ ХИРУРГИЯ

Сорока В.А., Нечаев А.Ю.
Предупреждение и коррекция нарушений газообмена при общей анестезии лошадей 40

РЕПРОДУКТОЛОГИЯ

Остриков Д.А., Павленко О.Б., Острикова Э.Е., Кошляк В.В., Жара М.Р.
Взаимосвязь заболеваний дистального отдела конечностей и воспроизводительной функции коров 44

Сысоева О.Е., Миронова Л.П., Сулейманов С.М., Павленко О.Б.
Усовершенствование устройства для искуственного осеменения кроликов в условиях промышленного воспроизводства 47

ФАРМАКОЛОГИЯ

Ахмед М.А., Захаркина Н.И., Пудовкин Н.А., Щербакова Е.Н.
Влияние антигельминтиков на гематологические показатели организма овец, больных мониезиозом 53

Корсакова М.В., Енгашев С.В., Гончарова М.Н.
Терапевтическая эффективность препарата Эмикон при аргулезе ленских осетров (*Acipenser baerii brand*, 1869) 58

ВЕТСАНЭКСПЕРТИЗА

Степанова М.В., Узелкова С.Ю., Онегина П.А.
Содержание тяжелых металлов и мышьяка в пищевых куриных яйцах 63

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ АНАТОМИЯ

Кудряшов А.А., Балабанова В.И., Ктитаров Д.С., Ефремов С.Л., Овченков И.А.
Патоморфологические изменения в месте инъекции препарата железа у свиней 69

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 16.06.2021. Дата выхода: 21.06.2021. 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, 2021

Actual Questions of Veterinary Biology № 2 (50)

June 2021

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

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

Computer design
Kondrashenkov S.V.

Editorial Board

Aliev A. A.,
Dr. Vet. Sci., Professor

Andreeva N. L.,
Dr. Biol. Sci., Professor

Belova L. M.,
Dr. Biol. Sci., Professor

Georgiev B. A.
Associate Professor, Ph.D

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

Ravilov R.H.,
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

CONTENTS

VIRUSOLOGY

Orynbaev M.B., Kopeev S.K., Tulendibaev A.B., Rystaeva R.A., Sultankulova K.T.
Susceptibility of saigas to lumpy skin desease in experimental infection 3

PARASITOLOGY

Novozhenova V.S., Yangirova L.Y.
Comparative analysis of infection index of *Cystoisospora felis* and *Toxascaris leonina* in cats 10

Slobodyanik R.V., Zykova S.S., Kryazhev A.L.
Epizootological features of dirophilariosis in the population of stray dogs of the Ararat region of the Republic of Armenia 12

DIAGNOSTICS

Doronin M.I., Michalishin D.V., Mudrak N.S.
Mediated determination of infectious titer of rabies virus in raw materials for vaccines using transcription amplification and beacon-technology 18

Doronin M.I., Michalishin D.V., Borisov A.V., Mudrak N.S., Michalishin V.V.
Mediated control of the completeness of inactivation of antigen of the rabies virus for rabies vaccines using a polymerase chain reaction 25

THERAPY

Sitchikhina A.V.
Application of autohemotherapy in complex treatment non-infectious pathology of young cattle..... 35

VETERINARY SURGERY

Soroka V.A., Nechaev A.Yu.
Prevention and correction of gas exchange violations in general anesthesia of horses 40

REPRODUCTOLOGY

Ostrikov D.A., Pavlenko O.B., Ostrikova E.E., Koshlyak V.V., Zhara M.R.
Relationship between distal limb diseases and cow reproduction 44

Sysoeva O.E., Mironova L.P., Suleimanov S.M., Pavlenko O.B.
Impovement of the device for artificial insemination of rabbits in the conditions of industrial reproduction in order to prevent artificially acquired infertility 47

PHARMACOLOGY

Akhmed M.A., Zakharkina N.I., Pudovkin N.A., Shcherbakova E.N.
The effect of anthelmintics on the hematological parameters of the body of sheep with moniesiosis 53

Korsakova M.V., Engashev S.V., Goncharova M.N.
Therapeutic efficacy of Emicon against fish argulosis at siberian sturgeon (*Acipenser baerii brand*, 1869) 58

VETERINARY AND SANITARY EXAMINATION

Stepanova M.V., Uzelkova S.Yu., Onegina P.A.
Content of heavy metals and arsenic in edible chicken's eggs 63

PATHOLOGICAL ANATOMY

Kudriashov A.A., Balabanova V.I., Ktitarov D.S., Efremov S.L., Ovchenkov I.A.
Pathomorphological changes at the injection site of the iron preparation in pigs 69

Publishing of Institute of Veterinary Biology
Address of the editoral office/publisher: 197198, St.-Petersburg, Oranienbaumskaya st., 3-Б. Tel. +7 (812) 232-55-92, fax: 232-88-61. E-mail: virclin@mail.ru. Site: invetbio.spb.ru
Signed for press on 16.06.2021. Issue date: 21.06.2021. 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, 2021

DOI: 10.24412/2074-5036-2021-2-3-8
УДК 619: 619.98:578.821.2:636:22/28
Ключевые слова: Нодулярный дерматит, Казахстан, ПЦР, вектор, эпидемиология
Key words: Lumpy skin disease, Kazakhstan, PCR, vector, epidemiology

[1]Орынбаев М.Б., [1,2]Копеев С.К., [1]Тулендибаев А.Б., [1]Рыстаева Р.А., [1]Султанкулова К.Т.

ВОСПРИИМЧИВОСТЬ САЙГАКОВ К НОДУЛЯРНОМУ ДЕРМАТИТУ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЗАРАЖЕНИИ

SUSCEPTIBILITY OF SAIGAS TO LUMPY SKIN DISEASE IN EXPERIMENTAL INFECTION

[1]Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности КН МОН РК
Адрес: 080409, Казахстан, Жамбылская область, пгт. Гвардейский
Research Institute of Biological Safety Problems of the science committee of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan
Addres:080409, Kazakhstan, Zhambyl region, uts Gvardeysky
[2]Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И.Скрябина
Адрес: 720005, Кыргызстан, г. Бишкек
Kyrgyz National Agrarian University named after K.L. Scriabin
Addres:720005, Kyrgyzstan, Bishkek city

Орынбаев Мухит Бармакулы, кандидат ветеринарных наук, профессор,
член-корреспондент Национальной Академии Наук Республики Казахстан.
E-mail:omb65@mail.ru
Orynbaev Mukhit Barmakuly, PhD of Veterinary Science, Professor, Corresponding Member National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. E-mail:omb65@mail.ru
Копеев Сырым Калдыбаевич, магистр ветеринарных наук. E-mail:kopeyev85@mai.ru
Kopeyev Syrym Kaldybayevich, Master of Veterinary Science. E-mail:kopeyev85@mai.ru
Тулендибаев Али Бахытжанович, магистр ветеринарных наук. E-mail:tulendibaev93@mail.ru
Tulendibaev Ali Bakhytzhanovich, Master of Veterinary Science. E-mail:tulendibaev93@mail.ru
Рыстаева Рашида Аусекановна, магистр естествознания. E-mail: oj-rashida@mail.ru
Rystaeva Rashida Ausekanovna, Master of Natural Science. E-mail:oj-rashida@mail.ru
Султанкулова Куляйсан Турлыбаевна, кандидат биологических наук, профессор.
E-mail: sultankul70@mail.ru
Sultankulova Kulyaisan Turlybayevna, PhD of Biological Science, Professor. E-mail: sultankul70@mail.ru

Аннотация. Нодулярный дерматит как эмерджентная трансграничная болезнь крупного рогатого скота распространена во многих странах Африки, в настоящее время получил широкое распространение в ближнем востоке, Европе и Южной Азии. В июле 2016 г. в первые зарегистрирован среди поголовья крупного рогатого скота в Атырауской области Республики Казахстан. Экспериментальное заражение сайгака вирусом нодулярного дерматита показало, что сайгаки восприимчивы к данному заболеванию. Сайгак пал на 23 сутки после заражения. Гибель сайгака подтверждена выделением вируса, электронной микроскопией и ПЦР. На территории Казахстана обитает основная популяция сайгака. Распространение вируса в популяции сайгака может существенно повлиять на популяцию вида. Необходимо проведение исследований по изучению восприимчивости сайгака к вирусу нодулярного дерматита КРС и роли этого вида в эпидемиологии данного заболевания.

Summary. *Lumpy skin disease as an emergent cross-border bovine disease is common in many African countries, and is now widespread in the Middle East, Europe, and South Asia. In July 2016, it was registered for the first time among the cattle population in the Atyrau region of the Republic of Kazakhstan. Experimental infection of saigas with lumpy skin disease virus showed that saigas are susceptible to this disease. The saiga fell on the 23rd day after infection. The death of the saiga antelope was confirmed by the isolation of the virus, election microscopy and PCR. The main population of saiga antelope lives on the territory of Kazakhstan. The spread of the virus into the saiga population can significantly affect the population of the species. It is necessary to conduct research on the susceptibility of saiga antelope to the virus of nodular dermatitis of cattle and the role of this species in the epidemiology of this disease.*

avvb_2021_02.indd 3 26.06.2021 20:36:59

Введение

Нодулярный дерматит (НД) (*Lumpy skin disease*) – контагиозная вирусная болезнь крупного рогатого скота (КРС), характеризующаяся интоксикацией организма, лихорадкой, папулезно-пустулезными поражениями кожи и слизистых оболочек [4]. Она наносит огромный экономический ущерб скотоводству, слагающийся из гибели и вынужденного убоя больных животных, снижения продуктивности, затрат на проведение ветеринарно-санитарных и охранно-карантинных мероприятий.

К заболеванию восприимчивы КРС и буйволы. Имеются отдельные сообщения о чувствительности некоторых диких жвачных животных к вирусу НД. В естественных условиях клинические признаки заболевания наблюдали у арабского орикса (*Oryx leucoryx*) [2] и у спрингбока (*Antidorcas marsupialis*) [6]. Восприимчивость диких животных также была продемонстрирована обнаружением нейтрализующих антител у африканского буйвола (*Syncerus caffer*), синего гну (*Connochaetes taurinus*), черного антилопа гну (*Connochaetes gnou*), канны (*Taurotragus oryx*), водяного козла (*Kobusel lipsiprymnus*), куду, жирафа и импалы в Чаде, Зимбабве, Замбии, Кении, Ботсване и Южной Африке [1, 3]. После экспериментальной инокуляции импалы (*Aepyceros melampus*), газели Томсона (*Gazella thomsonii*) и жирафа (*Giraffa camelopardalis*) на коже развились LSD-поражения [12].

Возбудитель НД является ДНК-содержащий вирус рода *Capripox virus* семейства *Poxviridae* [9].

НД относится к особо опасным болезням, которые имеют способность к быстрому распространению. Впервые оно было зарегистрировано в Центральной Африке в 1929 году как ложная крапивница. В 1940-х годах оно было идентифицировано как инфекционное заболевание, вызванное вирусом нодулярного дерматита. Долгое время распространение НД ограничивалось африканским континентом, с 1989 г. является достаточно распространенной болезнью на территории стран Ближнего Востока [11]. В 2014 и 2016 годах болезнь распространилась на Юго-Восточную Европу, Балканы и Россию [8, 13]. В странах СНГ заболевание впервые зарегистрировано в Азербайджане в 2014 г., откуда через Северный Кавказ распространилось на европейскую часть России [8, 13]. В июне 2016 г. заболевание было зарегистрировано в Атырауской области Казахстана [7]. Появление заболевания в Казахстане может иметь серьёзные последствия. Фауна Казахстана богата различными видами парнокопытных животных, которые могут быть восприимчивы к данному заболеванию, а большое количество различных видов эндемичных насекомых и клещей могут способствовать укоренению данного заболевания и дальнейшему распространению в другие регионы. Наши исследования были направлены на оценку чувствительности сайгака (*Saiga tatarica tatarica*), вида, находящегося под угрозой исчезновения (МСОП 2019), к нодулярному дерматиту.

Материалы и методы

Дизайн заражения сайгаков. Экспериментальное исследование заражения сайгака проводилось в конце 2018 – начале 2019 года. Для заражения был использован сайгак 4-летнего возраста, который содержался в вольере Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности (НИИПББ). Новорожденный сайгак был привезен в НИИПББ в 2014 г. из Костанайской области.

Единственное животное в этом исследовании содержалось в изоляторах для животных, оборудованных фильтрами HEPA, чтобы предотвратить утечку патогена в окружающую среду. Питьевая вода и сено подавались вволю, а гранулированный корм – два раза в день.

Кровь у животного собирали за 20 дней до инфицирования с использованием вакутейнеров BD Vacutainer Plus Serum Blood Collection Tube – 6 мл (BD, Plymouth.PL6 7BP, UK). Стерильную сыворотку тестировали в реакции нейтрализации на наличие антител к каприпокс вирусам. Животное было серонегативным к каприпокс вирусам.

Для заражения сайгака использовали штамм вируса НД Nodulares / Dermatitis / Atyrau-2016, выделенный в культуре LT-клеток

avvb_2021_02.indd 4 26.06.2021 20:36:59

с биологической активностью 5,5 lgТЦД$_{50/см^3}$. Перед заражением у животного измеряли температуру тела, исследовали на наличие каких-либо физиологических отклонений. Вирус вводили подкожно в среднюю треть шеи в дозе 100 000 ТТЦД$_{50}$.

За животным проводили клиническое наблюдение с ежедневным измерением температуры тела. Ежедневно проводился осмотр полости рта и носа, безволосых участков кожи, пальпация участков кожи на предмет изменений. Начиная с 1 дня после заражения у животного брали кровь и мазки из носа. Кровь собирали из яремной вены с использованием вакутейнеров (BD Vacutainer® EDTA K2E). Мазки из носа, собранные с помощью стерильных ватных тампонов, помещали в стерильные криопробирки с фосфатно-солевым буферным раствором. Собранные образцы крови и мазки замораживали при температуре минус 70 °С и хранили до исследования.

После гибели животного отбирали с помощью вакутейнера кровь из сердца. Стерильные образцы были собраны из легких, селезенки, лимфатических узлов, печени и почек.

Образцы крови, мазки и супернатанты органов исследовали с помощью ПЦР на наличие ДНК вируса НД. Образцы органов исследовали с помощью электронной микроскопии. Положительными в ПЦР образцами инфицировали культуру клеток тестикул ягнят (ТЯ). Специфичность цитопатического эффекта в культуре клеток подтверждена методом ПЦР.

Чтобы исключить сопутствующие вирусы и бактерии биологические образцы павшего сайгака были исследованы на наличие ДНК / РНК различных вирусов и бактерий.

Обнаружение вирусов чумы мелких жвачных животных, ящура, блютанга проводилось с использованием специфических наборов RT-PCR Target Specific Reagents (RT-PCR Kit, Tetracore, Rockville USA). Амплификацию и анализ ее продуктов проводили в Light Cycler 2.0 (Roche).

Обнаружение пастерелл и микоплазм проводилось методом ПЦР.

Выделение вируса в культуре клеток. Для этого использовали первичную культуру клеток теститкул ягнят (ТЯ) и перевиваемую культуру клеток почки быка (MDBK) [7].

Выделение каприпокс вируса из суспензии образца проводили, как описано в протоколах Всемирной организации животных.

Выделение ДНК. Выделение ДНК проводят с помощью набора “DNeasy® Blood&Tissue Kit (250)” фирмы QIAGEN согласно протоколу изготовителя.

Постановка ПЦР. Наработку ПЦР-продуктов проводили с использованием набора Ampli Taq Gold (Applied Biosystems). Для выявления и идентификации вируса НД, при постановке ПЦР использованы праймеры на видоспецифический ген GPCR, кодирующий рецептора хемокинов G-белок. Размер полученных амплификонов соответствовал ожидаемому размеру ПЦР продукта (~200 п.н.). Реакционная смесь содержала 25 мкл 2х буферов Ampli Taq Gold, по 1 мкл 20 пкм праймеров, 1 мкл ДНК и воды до 50 мкл. Последовательности прямого и обратного праймера: 5'-TTTCCTGATTTTTCTTACTAT-3' и 5'-AAATTATATACGTAAATAAC-3', соответственно. Режимы амплификации: начальная денатурация прошла при 95 °С в течение 5 минут, денатурация при 94 °С – 45 сек, отжиг при 56–60 °С в течение 45 сек, репликация при 72 °С в течение 2 мин, 35 циклов, пострепликация при 72 °С в течение 10 минут [7, 9].

Электрофорез ДНК в 2 % агарозном геле проводили, используя ТВЕ буфер, содержащий 1 мкл/мл бромистого этидия. Использовали аппарат для электрофореза нуклеиновых кислот G-100, Pharmacia.

Электронная микроскопия. Для изучения морфологии вируса нодулярного дерматита использовали образцы, выделенные от патологических материалов (кожа, бугорчатка) КРС и насекомых. Вирусный препарат нодулярного дерматита исследовали под электронным микроскопом (JEM-100 CX), используя негативное контрастирование 4 % раствором фосфатно-фольфрамовой кислоты pH 6,8.

Результаты исследований и обсуждение

Сайгак, не содержащий в крови антител к каприпокс вирусам, был инфицирован

avvb_2021_02.indd 5 26.06.2021 20:36:59

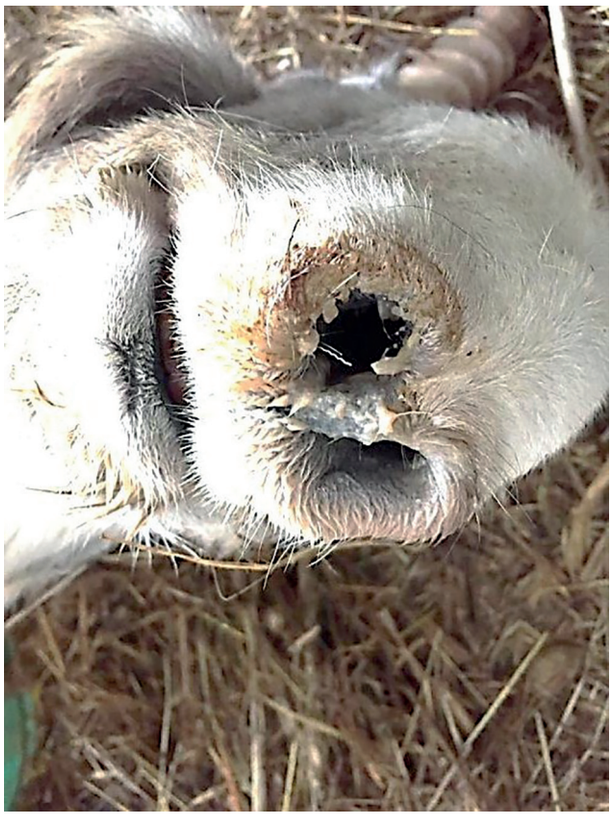

Рис. 1. Серозные истечения у сайгака, зараженного вирусом НД.

вирусом НД, и за животным вели клиническое наблюдение в течение 23 дней. На 4-й день после инфицирования в месте введения вируса регистрировали припухлость диаметром приблизительно 1 см. На 10-е сутки припухлость в диаметре достигла 1,4 см, а на 17-е сутки после инфицирования припухлость исчезла (рассосалась). Температура тела в период наблюдения колебалась в пределах 39,5–40,3 °С. Нормальные колебания температуры тела сайгака неизвестны. На 21-е сутки у животного отсутствовал аппетит, и регистрировались серозные выделения из носа и депрессия (рис. 1). Поражения кожи не были выявлены. Животное внезапно умерло на 23-й день после заражения (рис. 2).

У павшего животного были собраны образцы внутренних органов и кровь из сердца. Все смывы от зараженных сайгаков, кровь и органы от павших животных были исследованы в ПЦР на наличие вируса НД (табл. 1). Вирус в крови обнаруживали, начиная с 10-го дня, а в мазках из носоглотки с 11-го дня после заражения и вплоть до гибели животного. Вирус НД был также обнаружен во всех органах (селезенка, лимфатические узлы, печень, почки и легкие) и в крови сердца мертвого сайгака. Положительные образцы использовали для инфицирования первичных трипсинизированных культур клеток ТЯ. Вирус НД был выделен из всех испытанных образцов.

Образцы (легкие, селезенка, лимфатические узлы) от мертвого сайгака были протестированы с помощью ПЦР на наличие *Pasteurella multocida, Mannheimia haemolytica* (причины пастереллеза), микоплазмы овипневмонии, чумы мелких жвачных животных, ящура и вируса блютанга. Во всех пробах были получены отрицательные результаты.

Специфичность выделенных вирусов была подтверждена в ПЦР и электронной микроскопией. Во всех образцах был получен продукт амплификации размером 192 п.н. характерный для вируса НД. В результате исследования морфологии и тонкой структуры негативно-окрашенных препаратов были обнаружены вирусные частицы характерные для вируса НД. Размеры вирионов варьировали в пределах 300х370 нм, тогда как основная масса частиц (90%) имела размеры 300х350 нм (рис. 3).

НД – одно из социально значимых особо опасных вирусных заболеваний животных, к которому в последние годы приковано внимание ветеринарных врачей всего мира. За короткий период времени заболевание распространилось из стран Африки через ближний восток в Европу, Азербайджан, Россию и нанесло существенный урон экономике данных стран [7, 8, 13]. Анализ данных литературы

Рис. 2. Сайгак, павший на 23-и сутки после экспериментального заражения вирусом НД.

avvb_2021_02.indd 6 26.06.2021 20:36:59

Таблица 1

Результаты исследования образцов сайгака

Образцы	НД		ПЦР					
	ПЦР	Выделение вируса (lg ТЦД50/мл)	Ящур	ЧМЖЖ	*M. ovip-neumonia*	Блютанг	*M. haemo-lytica*	*P. multocida*
Назальные смывы	Полож. 10-22 дпи	+	Отр	Отр	Отр	Отр	Отр	Отр
Кровь	Полож. 10-22 дпи	+	Отр	Отр	Отр	Отр	Отр	Отр
Лимфатические узлы	Полож.	+ (1,43±0,11)	Отр	Отр	Отр	Отр	Отр	Отр
Селезенка	Полож.	+ (1,31±0,06)	Отр	Отр	Отр	Отр	Отр	Отр
Легкие	Полож.	+ (1,43±0,06)	Отр	Отр	Отр	Отр	Отр	Отр
Печень	Полож.	+ (0,93±0,11)	Отр	Отр	Отр	Отр	Отр	Отр
Почки	Полож.	+ (0,68±0,11)	Отр	Отр	Отр	Отр	Отр	Отр
Кровь из сердца после гибели	Полож.	+	Отр	Отр	Отр	Отр	Отр	Отр

Примечания: Д.п.и – день после инфекции; “+” – выделение вируса; Пол – положительно; Отр – Отрицательно.

показывает, что заболевание имеет тенденцию к быстрому распространению. Заболевание за короткий период распространилось на Кавказе, южных регионах России и занесено на территорию Казахстана. Первые случаи заболевание животных НД в Казахстане были зарегистрированы в конце июня – начале июля 2016 г. в Курмангазинском районе Атырауской области [7]. Учитывая значительную плотность поголовья скота на территории Казахстана, а также векторов возможно дальнейшее распространение этой инфекции, что может привести к серьезным социально-экономическим последствиям.

Для искоренения этой инфекции необходимо изучение всех звеньев эпизоотического процесса. Работ по исследованию патогенности вируса нодулярного дерматита для диких жвачных животных в настоящее время крайне недостаточно для оценки роли таких животных в передаче вируса. Имеются данные, что при экспериментальном заражении к вирусу восприимчивы жирафы и антилопы импала [12], и это исследование предполагает, что сайгаки также

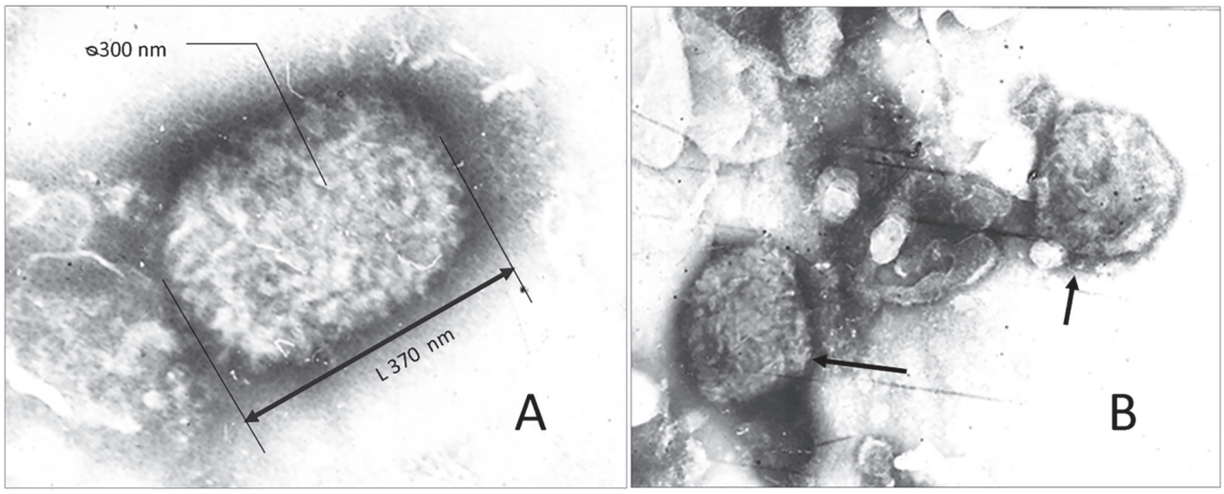

Рис.3. Электронная микроскопия препаратов изолята нодулярного дерматита. Ув. х125 000 (А) и х60 000 (В).

avvb_2021_02.indd 7 26.06.2021 20:36:59

могут быть хозяевами. Мы впервые оценили патогенность вируса нодулярного дерматита, выделенного от КРС на территории Атырауской области в 2016 году, для сайгаков. Сайгак один из многочисленных видов диких парнокопытных Казахстана. Большая часть мировой популяции сайгака обитает в Республике Казахстан. Сайгак мигрирует на большие расстояния дважды в год и в ходе своих миграций может быть источником заражения и распространения различных заболеваний, в том числе и НД. Можно ожидать, что по мере увеличения популяции сайгака общая площадь среды обитания, занимаемой сайгаком, будет увеличиваться. Вполне вероятно, что будут контакты между сайгаком и домашним скотом, а это в свою очередь будет способствовать передаче болезней как от сайгака домашнему скоту, так и наоборот.

Это исследование было направлено, чтобы расширить понимание роли сайгаков в поддержании вируса НД путем определения его чувствительности к данному заболеванию. Наши исследования показали, что сайгак, экспериментально зараженный вирусом НД, заболел без проявления клинических признаков заболевания (кожные высыпания отсутствуют) и пал на 23 сутки. Специфичность заболевания сайгака было подтверждено в ПЦР и выделением вируса в культуре клеток ТЯ. Отсутствие клинических признаков заболевания у сайгака возможно связано с биологией данного вируса. Так при экспериментальном заражении не всегда удается воспроизвести заболевания с типичными клиническими признаками даже у крупного рогатого скота [5, 10], но у сайгака отмечена виремия. В исследованиях, проведенных Kitching и др., [5] показали, что из 40 экспериментально зараженных животных у 25 наблюдалась местная реакция, и только у 9 наблюдалась генерализованная форма болезни и виремия в течение 9 дней. Tuppurainen и другие [10] также отметили, что тяжесть клинических признаков не коррелирует с продолжительностью виремии у экспериментально инфицированного крупного рогатого скота. Наблюдались длительные периоды отсутствия клинических признаков. Наши данные по сайгаку согласуются с данными этих исследований.

Выводы

Таким образом, показано, что сайгак восприимчив к экспериментальному заражению вирусом НД, но потребуется проведение дополнительных исследований, чтобы подтвердить, являются ли сайгаки потенциальными хозяевами и могут ли они иметь значение для поддержания и распространения НД в Казахстане. Для окончательного утверждения данной гипотезы необходимо проведение исследований по изучению восприимчивости сайгака к вирусу НД на большем количестве животных. Кроме того, необходимо проводить мониторинг популяций сайгаков в дикой природе с целью установления роли данного вида животных в поддержании и распространении НД.

Список литературы

1. Barnard B. J. Antibodies against some viruses of domestic animals in southern African wild animals / B. J. Barnard // Onderstepoort Journal of Veterinary Research.1997. Vol. 64. P. 95–110.

2. Greth A. Capripox virus disease in an Arabian Oryx (Oryx leucoryx) from Saudi Arabia / A. Greth, J. M. Gourreau, M. Vassart, Ba-Vy Nguyen, M. Wyyers, P. C. Lefevre // Journal of Wild life Diseases. 1992. Vol. 28. P. 295–300. http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-28.2.295.

3. Hedger R.S. Neutralising antibodies to lumpy skin disease virus in African wildlife / R. C. Hedger, C. Hamblin // Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 1983. Vol. 6. P. 209–213. http://dx.doi.10.1016/0147-9571(83)90012-7.

4. Kitching R. P. Transmission of capripox viruses / R. P. Kitching, W.P. Taylor // ResVetSci. 1985. № 39. P. 196–199.

5. Kitching R. P. The clinical response of cattle experimentally infected with lumpy skin disease (Neethling) virus / R. P. Kitching, V. M. Carn // Archive of Virology. 1995. Vol. 140. P. 503–513.

6. Last R. D. Lumpy Skin Disease of Springbok / R. D. Last // CPD Articles. 2017. Vol. 11. №4. 12 p.

7. Orynbayev M. B. Lumpy skin disease in Kazakhstan / M. B. Orynbayev, R. K. Nissanova, S. K. Kopeyev, A. Issimov, K. D. Zakarya, K. T. Sultankulova, L. B. Kutumbetov, A. B. Tulendibayev, B. Myrzakhmetova, E. D. Burashev, O. V. Chervaykova, S. S. Nurabayev, A. K. Nakhanov, R.A. Kock // Tropical Animal Health and Production. 2021. Vol. 53. 166 p. https://doi.org/10.1007/s11250-021-02613-6.

avvb_2021_02.indd 8 26.06.2021 20:36:59

8. Salnikov N. Identification and characterization of lumpy skin disease virus isolated from cattle in the Republic of North Ossetia Alania in 2015 / N. Salnikov, T. Usadov, A. Kolcov, S. Zhivoderov, Y. Morgunov, V. Gerasimov, A. Gogin, I. Titov, S. Yurkov, A. Malogolovkin, D. Kolbasov, A. Lunitsyn // Transbound Emerg Dis. 2018. P. 1–5. https://doi.org/10.1111/tbed.12818.

9. Tulman E. R. Genome of lumpy skin disease virus / E. R. Tulman, C. L. Afonso, Z. Lu // J Virol. 2001. P. 2–4.

10. Tuppurainen E. S. M. The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques / E. S. M. Tuppurainen, E. H. Venter, J. A. W. Coetzer // Onderstepoort J. Vet. Res. 2005. Vol. 72. P. 153–164.

11. Wainwright S. Emergence of lumpy skin disease in the Eastern Mediterranean Basin countries / S. Wainwright, A. ElIdrissi, R. Mattioli, M. Tibbo, F. Njeumi, E. Raizman // FAO Empres Watch. 2013. № 29. P. 1–6.

12. Young E. Experimental infection of game animals with lumpy skin disease virus / E. Young, P. A. Basson, K. E. Weiss // Onderstepoort J VetRes. 1970. Vol. 37. № 2. P. 79–87.

13. Zeynalova S. Epizootology and molecular diagnosis of lumpy skin disease among livestock in Azerbaijan / S. Zeynalova, K. Asadov, F. Guliyev, M. Vatani, V. Aliyev // Frontiers in Microbiology. 2016. №7. 1022 p. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01022

avvb_2021_02.indd 9 26.06.2021 20:36:59

DOI: 10.24412/2074-5036-2021-2-10-12
УДК 619:004.6.
Ключевые слова: *Cystoisospora felis*, *Toxascaris leonina*, мониторинг, паразитоз, кошки.
Key words: Cystoisospora felis, Toxascaris leonina, monitoring, parasitosis, cats.

Новоженова В. С., Янгирова Л. Я.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЗАРАЖЕННОСТИ КОШЕК *CYSTOISOSPORA FELIS* И *TOXASCARIS LEONINA*

COMPARATIVE ANALYSIS OF INFECTION INDEX OF CYSTOISOSPORA FELIS AND TOXASCARIS LEONINA IN CATS

ФГАОУ ВО «Тюменский государственный университет»
Адрес: 625003, г. Тюмень, ул. Володарского, д. 6
Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Tyumen State University»
Address: 6, Volodarsky st., Tyumen, 625003, Russia

Новоженова В. С., студент 5 курса, Институт биологии. E-mail: stud0000108968@study.utmn.ru
Novozhenova V. S., Student, 5th year, Institute of Biology. E-mail: stud0000108968@study.utmn.ru
Янгирова Л. Я., студент 5 курса, Институт биологии
Yangirova L. Y., Student, 5th year, Institute of Biology

Аннотация. В настоящее время широкое распространение инвазионных болезней среди одного или нескольких видов животных является серьёзной проблемой как в сельском хозяйстве, так и в условиях частного сектора. В работе рассмотрено сравнение эпизоотической ситуации по следующим паразитарным болезням: цистоизоспороз, токсаскаридоз в нескольких городах России (Иваново, Краснодар, Московская область) на основе баз данных. Более 20 % кошек заражены *Cystoisospora felis* – паразитарной болезнью, вызываемой простейшими. Паразитические аскариды *Toxascaris leonina* опасны для кошек, собак и могут представлять угрозу для человека. Основные особенности паразитозов: среда обитания – организменная (внутри животного), возможность длительного существования в теле хозяина (до полугода для *T. leonina)*, необходимость в резервуарном и конечном хозяине для завершения своего цикла развития. Предотвращению подобных проблем способствует, в первую очередь, тщательный анализ заболевших особей и паразитов, этому поспособствовавших: их мониторинг, классификация и выявление с помощью баз данных (БД) и систем управления базами данных (СУБД).

Summary. *At present, the wide spread of invasive diseases in the area among one or several animal species, significantly exceeding the level of morbidity usually recorded in animals in a given area, is a serious problem both in agriculture and in the detached houses. The paper considers a comparison of the epizootic situation for the following parasitic diseases: cystoisosporosis, toxascariasas in several Russian cities (Ivanovo, Krasnodar, Moscow region). More than 20 % of cats are infected with Cystoisospora felis – a parasitic disease caused by protozoa. Parasitic roundworms Toxascaris leonina are dangerous for cats, dogs and it would be able endanger to humans. The main features of parasitoses: habitat – is organismic (inside the animal), the possibility of long-term existence in the host's body (for half-year for T. leonina), the need for an reservoir and final host to complete its development cycle. The prevention of such problems is facilitated, first of all, by a thorough analysis of diseased individuals and parasites that contributed to this: their monitoring, classification and identification using a database (DB) and database management systems (DBMS).*

Введение

Домашние кошки – очень распространенные питомцы в России. На 2018 год домашних кошек насчитывается около 33,7 млн. (по данным Международной информационной группы «Интерфакс»), около 3 млн. содержат граждане Санкт-Петербурга и Москвы (по данным информационного агентства «РБК»), в Иваново – более 2000 особей [2]. Многие хозяева предпочитают породистых кошек, берут их у заводчиков, другие берут беспородных кошек с улицы. Большинство бездомных кошек имеют паразитарные, инфекционные болезни, а так же клещей и блох. Часто обнаруживаются паразитические простейшие – изоспоры у кошек, которые не заражают человека, и паразитические нематоды – токсаскары, паразитирующие у кошек. Для человека токсаскары могут представлять опасность в дальнейшем в связи с имеющимися

avvb_2021_02.indd 10 26.06.2021 20:37:00

данными о способности личинок поражать ткани лабораторных животных [5].

Отслеживание и формирование данных об эпизоотических заболеваниях необходимо для предотвращения заражения человека и животных. В связи с импортом больных животных ухудшается эпизоотическая ситуация по инфекционным болезням [3]. Эпизоотологический мониторинг обеспечивает основу для мер по предотвращению распространения инфекционных и паразитарных заболеваний: выявление новых заболеваний, не характерных для данного района. Базы данных помогают установить точное местоположение импортируемых животных, их количество и время, возможные эпидемии, некоторую личную информацию о владельце.

Мониторинг паразитозов с помощью баз данных – это один из вариантов получения данных с возможностью прогнозирования, не выходя из лаборатории.

Целью нашей работы было сравнение эпизоотической ситуации по следующим паразитарным болезням: цистоизоспороз, вызываемый *Cystoisospora felis*, и токсаскаридоз, вызываемый *Toxascaris leonina*, в нескольких городах России на основе баз данных: Иваново, Краснодар, города Московской области.

Материалы и методы

Отбирали научные статьи, находящиеся в свободном доступе в сети Интернет, с исследованиями экстенсивности инвазии *C. felis* и *T. leonina* у кошек в российских городах и охватом изучения кошек из частного сектора за одинаковый период исследования. Данные исследований в публикациях оформлены в виде таблиц, на основе которых мы составили свою совмещенную таблицу. Мы использовали данные по городу Иваново [1] и по городу Краснодар, а также Московской области [4]. Статистическую обработку данных проводили по стандартной методике при помощи программы Statistica. Достоверность различий, сравниваемых результатов выявили по t-критерию Стьюдента. Различия считали статистически достоверными при уровне надежности P>0,95.

Результаты

В данной работе, мы дополнили экстенсивность инвазии (ЭИ) стандартной ошибкой выборки, посчитанной в программе Statistica. Сравнили заболеваемость кошек *C. felis* и *T. leonina* в Иваново, Краснодаре и Московской обл. с учетом t-критерия Стьюдента.

Т-критерий показал следующие значения сравнения городов по *C. felis* при уровне надежности 95%: Иваново – Краснодар = 2,957; Иваново – Московская обл. = 2,947; Московская обл. – Краснодар = 0,012. Т-критерий показал следующие значения сравнения городов по *T. leonina* при уровне надежности 95%: Иваново – Краснодар = 0,679; Иваново – Московская обл. = 0,906; Московская обл. – Краснодар = 0,373.

Таблица 1

Таблица 1. Экстенсивность инвазии *Cystoisospora felis* и *Toxascaris leonina* в разных районах

Паразит	Иссл.	Инваз.	ЭИ, %	Район	Источник
Cystoisospora felis	300	63	21,00±1,26	Иваново	Баландина В.Н., Крючкова Е.Н.
Cystoisospora felis	69	2	2,90±2,62	Краснодар	Ястреб В.Б., Шайтанов В.М.
Cystoisospora felis	34	1	2,94±3,74	Московская обл.	Ястреб В.Б., Шайтанов В.М.
Toxascaris leonina	300	24	8,00±1,26	Иваново	Баландина В.Н., Крючкова Е.Н.
Toxascaris leonina	69	1	1,45±2,62	Краснодар	Ястреб В.Б., Шайтанов В.М.
Toxascaris leonina	34	0	0,00±3,74	Московская обл.	Ястреб В.Б., Шайтанов В.М.

avvb_2021_02.indd 11 26.06.2021 20:37:00

Обсуждение результатов

Сравнение значений t-критерия Стьюдента с критическим показывает, что различия между городами по ЭИ *T. leonina* статистически недостоверны. Сравнение t-критерия Стьюдента с критическим значением показывает, что различия между городами по ЭИ *C. felis* статистически недостоверны между Московской областью и Краснодаром, различия статистически достоверны между Иваново и Московской областью, а также между Иваново и Краснодаром. Мы пришли к выводу, что использование статистической средней ошибки выборочной относительной величины для выборки с повторами позволяет точнее оценить результаты исследований ЭИ в различных городах и с различным объемом выборок. Применение t-критерия Стьюдента показывает различия между выборками, благодаря чему мы смогли оценить существование разницы между инвазиями кошек в Иваново, Московской области и Краснодаре по паразитозам *C. felis* и *T. leonina.*

Заключение

Обзор литературы подтверждает эффективность использования баз данных в борьбе с паразитарными болезням животных. Обнаружили, что статистически достоверно по ЭИ *C. felis* отличается Иваново от Краснодара и Московской области, по ЭИ *T. leonina* различия между городами статистически недостоверны. Между Краснодаром и Московской областью по ЭИ *C. felis* достоверных статистических различий не обнаружили. Применение баз данных может ускорить работу по изучению динамики заболеваний по годам, позволит составить план мониторинга на следующий временной период, а также подготовить меры по предотвращению распространения заболеваний среди животных. В совокупности применение баз данных и мониторинг дает возможность вовремя контролировать уровень заболеваемости кошек в городах, в том числе в частном секторе.

Список литературы

1. Баландина В. Н. Ассоциированные паразитозы кошек г. Иваново / В. Н. Баландина, Е. Н Крючкова // Теория и практика паразитарных болезней животных. 2015. № 16. С. 25–27.

2. Баландина В. Н. Структура фауны паразитов кошек в городе Иванове и факторы ее определяющие / В. Н. Баландина Е. Н. Крючкова // Теория и практика паразитарных болезней животных. 2017. №18. С. 45–46.

3. Муханбеткалиев Е. Е. Эпизоотологический мониторинг инфекционного ринотрахеита кошек в клиниках г. Нур-Султан / Е. Е. Муханбеткалиев, Е. Э. Кырыкбаева // Сборник материалов научной конференции «Актуальные проблемы молодежной науки в развитии АПК». 2020. С. 26–30.

4. Ястреб В. Б. Кишечные паразитозы взрослых собак и кошек, содержащихся в приютах для бездомных животных / В. Б. Ястреб, В. М. Шайтанов // Российский паразитологический журнал. 2017. №1 (39). С. 9–13.

5. Okulewicz A. Toxocara canis, Toxocara cati and Toxascaris leonina in wild and domestic carnivores / A. Okulewicz, A. Perec-Matysiak, K. Buńkowska, J. Hildebrand // Helminthologia. 2012. Vol. 49. P. 3–10.

DOI: 10.24412/2074-5036-2021-2-12-17
УДК 616.995.132.5:636.7(479.25)
Ключевые слова: дирофиляриоз, безнадзорные собаки, Армения, Араратская область
Key words: dirofilariosis, stay dogs, Armenia, Ararat region

Слободяник Р. В., [2]Зыкова С. С., [3]Кряжев А. Л.

ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДИРОФИЛЯРИОЗА В ПОПУЛЯЦИИ БЕЗНАДЗОРНЫХ СОБАК АРАРАТСКОЙ ОБЛАСТИ РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ

EPISOOTOLOGICAL FEATURES OF DIROPHILARIOSIS IN THE POPULATION OF STRAY DOGS OF THE ARARAT REGION OF THE REPUBLIC OF ARMENIA

[2]ФГКВОУ ВО «Пермский военный институт войск национальной гвардии Российской Федерации»
Адрес: 614112, Россия, Пермь, ул. Гремячий Лог, 1
Perm Military Institute of the National Guard Troops of the Russian Federation
Address: 614112, Russia, Perm, 1 Gremyachy Log
[3]ФГБОУ ВО «Вологодская государственная молочно-хозяйственная академия им. Н.В. Верещагина»
Адрес: 160555, Вологда-Молочное, ул. Шмидта, д. 2

avvb_2021_02.indd 12 26.06.2021 20:37:00

Vologda State Dairy Farming Academy named after N. V. Vereshchagin
Address:160555, Russia, Vologda, Molochnoe, 2 Shmidta

Слободяник Роман Викторович, кандидат ветеринарных наук, ветеринарный врач
Slobodyanik Roman Viktorovich, PhD of Veterinary Sciense, Veterinarian
Зыкова Светлана Сергеевна, доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры кинологии.
E-mail: zykova.sv@rambler.ru
Zykova Svetlana Sergeevna, Doctor of Biological Science, Professor of Department of Cynology.
E-mail: zykova.sv@rambler.ru
Кряжев Андрей Леонидович, доктор ветеринарных наук, доцент, профессор кафедры эпизоотологии и микробиологии. E-mail: kamarnett@mail.ru
Kryazhev Andrew Leonidivich, Doctor of Veterinary Science, Professor of the Department of Epizootology and Microbiology. E-mail: kamarnett@mail.ru

Аннотация. Статья посвящена изучению особенностей эпизоотической ситуации дирофиляриоза среди популяции безнадзорных собак в Араратской области Армении. Проанализированы условия жизни безнадзорных собак, численность которых заметно возрастает вблизи автостоянок, автозаправок, вдоль автодорог. В ряде случаев собаки собираются в стаи, состоящие из 7–10 животных, реже – одиночные особи. У большинства обследованных безнадзорных собак были взяты образцы периферической крови. Наличие микрофилярий устанавливали в результате световой микроскопии мазков крови, приготовленных по модифицированному методу Кнотта, а также при помощи иммуно-хроматографических тест-систем “Canine Heartworm Ag”. Результаты определения наличия инвазии и степени интенсивности процесса осуществлялись как по результатам диагностики, так и клинических проявлений. В отдельных случаях отмечены случаи неинформативности мазков крови по методу Кнотта, что, вероятно, связано с амикрофилярной стадией болезни. По отдельным морфологическим характеристикам (степень сточенности зубов, характер износа суставов) определяли возраст собак. В подавляющем большинстве случаев клинических изменений у животных не отмечалось. Было установлено паразитирование *Dirofilaria immitis* у 4 из 22 обследованных безнадзорных собак. Средняя экстенсивность инвазии составила 18 %, причем наиболее уязвимыми к инвазии оказались животные в возрасте 6 – 7 (75 %) и 4 (25 %) лет. Установили наибольшую инвазированность дирофиляриями сук (75 %), зараженность кобелей была значительно ниже (25 %). Таким образом, результаты наших исследований показывают, что на территории Араратской области Республики Армения активно функционирует местный очаг дирофиляриоза плотоядных, одним из ключевых звеньев которого являются безнадзорные собаки.

Summary. *The article dwells upon the study of the peculiarities of the epizootic situation of dirofilariasis among the population of stray dogs in the Ararat region of Armenia. The article analyzes the living conditions of stray dogs, the number of which is noticeably higher in the proximity of the parking lots, gas stations, and along the roads. Usually, the dogs gather in packs consisting of 7–10 animals, less often they live individually. Peripheral blood samples were taken from most of the stray dogs that have been part of the research. The presence of microfilariae was established by the light microscopy of blood smears prepared according to the modified Knott's method, as well as using “Canine Heartworm Ag” immunochromatographic test systems. The presence of invasion and the degree of intensity of the process were defined both according to the results of the diagnostics and the clinical manifestations. In some cases, the blood smears gave no information according to the Knott's method, which was probably due to the amicrofilar stage of the disease. The age of the dogs was determined according to individual morphological characteristics (the degree of teeth grinding, the nature of wear and tear of the joints). In most cases, no clinical manifestations of the disease were observed in animals. Dirofilaria immitis infiltration was found in 4 out of 22 stray dogs examined. The average extensiveness of invasion was 18 %, and the most vulnerable to invasion were the animals aged 6–7 years (75 %) and 4 years (25 %). The highest infestation with dirofilariae was detected in female dogs (75 %), the infestation of male dogs was significantly lower (25 %). Thus, the outcome of our research demonstrates that a local focus of dirofilariasis in carnivores is actively functioning in the territory of the Ararat region of the Republic of Armenia, stray dogs being one of the key participants in the disease distribution process.*

Введение

Решение глобальных экологических проблем современности, охрана биосферы и оздоровление среды обитания человека определяют новые направления для развития медицинской и ветеринарной служб. Социально-экономические потрясения, проходившие на всем постсоветском пространстве в конце прошлого века, привели к снижению ветеринарного надзора за домашними животными и уменьшению объемов проведения инсектицидных мероприятий. Снижение экономического благополучия региона привело к увеличению числа безнадзорных животных, в первую очередь, безнадзорных (безвладельческих) собак. Климатогеографические

avvb_2021_02.indd 13 26.06.2021 20:37:00

особенности Республики Армения способствуют росту плотности популяции кровососущих насекомых [6]. Взаимодействие этих факторов – антропогенного и естественного – приводят к серьезному повышению риска заражения и животных, и человека трансмиссивными инвазиями, среди которых особое место принадлежит дирофиляриозу.

Особого внимания заслуживает проблема безнадзорных животных, которая является многогранной, ее изучение необходимо для решения вопросов, связанных с экологией и санитарно-эпидемиологической безопасностью [3, 14].

Из литературных источников известно, что вблизи Республики Армения, на территории Ирана распространение дирофиляриоза среди безнадзорных собак составляет 30,3 % [16]. Возбудителем инвазии в Иране, как и на территории Республики Армения, является *Dirofilaria immitis* [17].

Араратская область Республики Армения является эндемически неблагополучной по дирофиляриозу, одному из наиболее опасных инвазионных болезней для собак [4, 5, 9, 10, 18]. Дирофиляриозы – тканевые зоонозные гельминтозы, вызываемые нематодами, относящимися к роду *Dirofilaria* Railliet & Henry, 1911. Болезнь характеризуется трансмиссивной передачей, медленным развитием, длительным течением и очаговым распространением. Заражение, как животных, так и человека происходит при укусах инвазированных комаров родов *Aedes*, *Culex* и *Anopheles* [5].

Собака – основной хозяин *D. repens* и *D. immitis* и главный источник распространения инвазии [1]. Анализ динамики по заболеваемости дирофиляриозом у собак и их хозяйственному применению в течение ряда лет показал, что изучение экстенсивности инвазии (ЭИ) проводили у безвладельческих и служебных собак [15]. Мы предполагаем, что основным резервуаром инвазии в популяции домашних собак могут выступать владельческие и безнадзорные животные [8].

Целью наших исследований было изучение зараженности дирофиляриями безнадзорных собак на территории Араратской области Республики Армения.

Материалы и методы

В период с декабря 2020 г. по февраль 2021 г. нами были обследованы безнадзорные собаки, находящиеся на территории населенных пунктов Араратской области Армении. Исследованию проведено с обследованием 22 собак обоего пола в возрасте от 5 месяцев до 8 лет. Возраст животных определяли путем опроса опекунов, по степени стирания зубов и общим морфологическим характеристикам.

Зараженность собак дирофиляриями определяли в условиях ветеринарных клиник. У животных брали периферическую кровь и исследовали методом микроскопии мазков по Кнотту. Согласно методике, к 1 мл венозной крови добавляли 10 мл 2 %-ного раствора формалина. Этот раствор хорошо перемешивали и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок смешивали с равным объемом метиленового синего в разведении 1:1 000 и оставляли для окрашивания на 5 мин. Окрашенный осадок микроскопировали для обнаружения фиксированных микрофилярий [2].

Для проведения диагностических мероприятий использовали серологический метод, одношаговые кассетные экспресс-тесты “Asan Easy Test Heartworm” (производство Asan Farm., Корея) для визуальной детекции антигена дирофиляриоза собак в сыворотке крови. С целью получения сыворотки, отобранные образцы крови на специальном оборудовании центрифугировались на месте. В отдельных случаях отмечены случаи неинформативности мазков крови по методу Кнотта, что, вероятно, связано с амикрофилярной стадией болезни. В мазках крови собак обнаруживали микрофилярии *D. immitis*.

Результаты исследований

Наши исследования показали, что на территории Араратской области из исследованных 22 безнадзорных собак, у 4 животных в крови были обнаружены микрофилярии. У инвазированных безнадзорных собак мы диагностировали только один вид возбудителей – *D. immitis*. Микрофилярии были выявлены у 1 кобеля и 3 сук. Общее поголовье

avvb_2021_02.indd 14 26.06.2021 20:37:00

Таблица 1

Заболеваемость *D. immitis* безнадзорных собак

пол животных	Исследуемые собаки здоровые/больные									ЭИ, %	Средняя ЭИ, %
	Щенки и молодые собаки до 1 года	2 лет	3 лет	4 лет	5 лет	6 лет	7 лет	Собаки в возрасте 8 лет и старше	Всего собак		
кобели	2/-	2/-	1/-	-	-	1/-	-/1	-	6/1	4,6	18,1
суки	3/-	3/-	2/-	-/1	1/-	-/2	1/-	2/-	12/3	13,6	

исследованных сук превышало поголовье исследованных кобелей, их соотношение составляло 67,5 % к 32,5 %.

В результате проведенных нами исследований установлено, что средняя ЭИ в популяции безнадзорных собак на территории Араратской области составляет 18 %. Средняя ЭИ среди кобелей составляет 4,6 %, а среди сук – 13,6 % (табл. 1).

Все исследованные собаки в возрасте до 4 лет были здоровы. 75 % заболевших животных относились к группе животных в возрасте 6–7 лет. Заболевание *D. immitis* регистрировалось у кобеля в возрасте 7 лет, а у сук – в возрасте 4 и 6 лет.

Обсуждение результатов

В результате проведенных нами исследований по обнаружению микрофилярий, при проведении иммуно-хроматографического анализа (ИФА) установлено, что возбудителем, как и в ранее проведенных исследованиях в хозяйствах Араратской области является *D. immitis*. Средняя ЭИ в популяции безнадзорных собак в Араратской области составляет 21 %, что, вероятно, является отражением высокой летальности зараженных животных, чей возраст старше 7–8 лет. Остались те животные, у которых наблюдается незначительная степень инвазии и возраст которых не старше 5–6 лет.

Проведенные нами в 2017 г. исследования собак в хозяйствах Араратской области выявили ЭИ у немецких овчарок 29,6 % [5], а у кавказских овчарок 16,6 % [18]. В 2019 г., благодаря принятым ветеринарно-профилактическим и лечебным мероприятиям, экстенсинвазированность у немецких овчарок удалось снизить до 3,6 % [8, 12].

В популяции безнадзорных собак зараженность кобелей и сук *D. immitis* составляла 16,6 % и 25 % соответственно. В ходе ранее проведенных нами исследованиях в хозяйствах Араратской области было установлено, что зараженность кобелей и сук *D. immitis* составляла 37,5 % и 62,5 % соответственно [8]. Высокая заболеваемость дирофиляриозом сук объясняется тем, что подавляющее поголовье исследованных безнадзорных собак было представлено суками. Суки и молодые собаки до года более доверчивы к человеку, уже при первом кормлении проявляли заинтересованность и охотно подходили за лакомством. Кобели вели себя настороженно и держались на безопасной для себя дистанции. Требовалось многодневное кормление различными лакомствами, чтобы подойти к ним на близкое расстояние и, тем более, провести диагностику.

Наиболее уязвимыми являются собаки в возрасте от 4 до 6 лет, по некоторым данным высокий риск заражения сохраняется до 8 лет [2]. В проведенных нами исследованиях в популяции безнадзорных собак микрофилярии выявляли у собак в возрасте от 4 до 7 лет. В исследуемой группе зараженными оказались собаки в возрасте 6–7 и 4 лет, что составило соответственно 75 и 25 % инвазированного поголовья собак. Ранее в хозяйствах Араратской области нами было выявлено паразитирование дирофилярий у пастушьих собак (кавказских овчарок) в возрасте от 3 до 5 лет [18, 19]. У немецких овчарок регистрировали дирофиляриоз в возрасте от 3 до 8 лет [7]. Полученные данные по безнадзорным животным только подтверждают возрастные границы собак, подверженных инвазии.

avvb_2021_02.indd 15 26.06.2021 20:37:00

Таким образом, результаты наших исследований показывают, что на территории Араратской области Республики Армения активно функционирует местный очаг дирофиляриоза плотоядных, наиболее уязвимыми являются собаки в возрасте от 4 до 6 лет.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о ключевой роли безнадзорных собак как источника дирофиляриоза в регионе. В популяции безнадзорных собак в Араратской области диагностирован только один вид возбудителя дирофиляриоза – *D. immitis.* Средняя ЭИ составляет 18,1 %. Но мы теоретически предполагаем, что в исследуемом регионе случаев дирофиляриоза значительно больше и не только среди домашних, но и диких плотоядных [11]. Выявленные случаи дирофиляриоза у безнадзорных собак говорят о постоянной циркуляции возбудителя в изучаемом регионе. Отсутствие профилактических мероприятий и рост численности бродячих животных обуславливает риск увеличения числа инвазированных плотоядных животных и человека [13].

Список литературы

1. Андреянов, О. Н. Дирофилярии центрального региона России // Биоэкологическое краеведение: мировые, российские и региональные проблемы. Материалы 5-й международной научно-практической конференции, посвященной 110-летию со дня рождения доктора биологических наук, профессора Л. В. Воржевой и 125-летию со дня рождения кандидата педагогических наук, доцента Г. Г. Штехера. Ответственный редактор С. И. Павлов. 2016. С. 127–131.

2. Архипов И.А. Дирофиляриоз. / И. А. Архипов, Д. Р. Архипова. М.: Изд-во Российской Академии сельскохоз. наук. 2004. 194 с.

3. Зинова А. Б. Проблема бездомных собак в Омске / А. Б. Зинова, В. И. Плешакова // Электронный научно-методический журнал Омского ГАУ. 2016. № 4 (7) С. 10.

4. Зыкова С. С. Меры профилактики дирофиляриоза у служебных собак / С. С. Зыкова, Р. В. Слободяник // Генерал от инфантерии Е. Ф. Комаровский – первый командир отдельного корпуса внутренней стражи России. Межвузовская научно-практическая конференция под общ. ред. В.Ф. Купавского. 2019. С. 313–315.

5. Кряжев А. Л. Дирофиляриоз служебных собак в Араратской области Республики Армения / А. Л. Кряжев, Р. В. Слободяник // Международный вестник ветеринарии. 2019. № 3. С. 16–21.

6. Нагорный С. А. Инвазия Dirofilaria spp.: динамика эпизоотической ситуации на юге России / С. А. Нагорный, Л. А. Ермакова // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. 2018. № 19. С. 318–320.

7. Слободяник Р. В. Мониторинг дирофиляриоза у собак в республике Армения / Р. В. Слободяник, С. С. Зыкова, А. Т. Асатрян, В. А. Ширяева // Международный вестник ветеринарии. 2020. № 1. С. 19–23.

8. Слободяник Р. В. Эпизоотологическая обстановка по дирофиляриозу собак в г. Ереване / Р. В. Слободяник, С. С. Зыкова, Л. В. Ванага // Международный вестник ветеринарии. 2021. № 1. С. 55–60.

9. Слободяник Р. В. Ретроспективный анализ дирофиляриоза в республике Армения / Р. В. Слободяник, С. С. Зыкова, А. Л. Кряжев // Международный вестник ветеринарии. 2020. № 4. С. 41–49.

10. Слободяник Р. В. Применение температурных ЕРД-моделей для прогнозирования дирофиляриоза у собак в различных областях Республики Армения / Р. В. Слободяник, С. С. Зыкова, А. Л. Кряжев // Российский паразитологический журнал. 2020. Т.14. № 4. С. 80–89.

11. Слободяник Р. В. К вопросу о роли шакала (*Canis aures L*) как возможного переносчика дирофиляриоза в республике Армения / Р. В. Слободяник, С. С. Зыкова, В. В. Масайтис // Охотоведение и охотничье хозяйство России и ближнего зарубежья. Современное состояние и перспективы (Чтения памяти А. А. Силантьева): Материалы всероссийского научно-практической конференции. Санкт-Петербург, 2020. С. 95–99.

12. Слободяник Р. В. Основные клинические признаки и ранняя диагностика дирофиляриоза собак в ветеринарной практике хозяйств республики Армения / Р. В. Слободяник, А. Л. Кряжев // Российский паразитологический журнал. 2020. Т.14. № 3. С. 63–68.

13. Соколов Е. А. Эпизоотология дирофиляриоза городской популяции собак в Ивановской области / Е. А. Соколов, Е. Н. Крючкова, Б. Г. Абалхин // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. 2019. № 20. С. 594–599.

14. Учасов Д. С. Бездомные животные как одна из экологических проблем городской среды обитания / Д. С. Учасов, Т. В. Смагина, Л. Ю. Королева, И. Э. Федотова, С. Ю. Пшинина // Природные ресурсы Центрального региона России и их рациональное использование: Материалы II Всерос. научно-практ. конф., посв. 60-летию кафедры почвоведения и прикладной биологии ОГУ им. И.С. Тургенева. Под общей редакцией И. Э. Федотовой. 2019. С. 102–107.

15. Ястреб В. Б. Гельминтозы: эхинококкоз и дирофиляриоз: биоморфологические особенности возбудителей, совершенствование мер борь-

avvb_2021_02.indd 16 26.06.2021 20:37:00

бы. Автореф. …дис. доктора вет. наук. М., 2009. С. 49.

16. Anvari D. Prevalence of dirofilariasis in shepherd and stray dogs in Iranshahr, southeast of Iran / D. Anvari, D Saadati, A. Siyadatpanah, S. Gholami // J. Parasit. Dis. Jun;43(2), 2019:319-323. doi: 10.1007/s12639-019-01096-5. Epub 2019 Feb 14. PMID: 31263340; PMCID: PMC6570724 (2019).

17. Hosseinzadeh V. M. Molecular detection and epidemiological aspects of Dirofilaria immitis in dogs in Tabriz and Suburbs. / V. M. Hosseinzadeh, H. J. Ashrafi, N. Salehi, A. Bazmani, A. Nematollahi, A. Imani Baran // Journal Mazandaran Univ. Med. Science. 26:20–31, (2016).

18. Zykova, S. Monitoring dirofilariasis spread: herding dogs in Armenia / S. Zykova, R. Slobodyanik, L. Belova, A. Kryazhev, A. Savinkov // E3S Web of Conferences, XIII International Scientific and Practical Conference “State and Prospects for the Development of Agribusiness – INTERAGROMASH 2020”. С. 03014.175, (2020).

19. Slobodyanik R. Blood morphology in dogs with dirofilariasis / R. Slobodyanik, S. Zykova, L. Belova, A. Kryazhev // E3S Web of Conferences. VIII International Scientifical and Practical Conference «Innovative technologies in science and education» (ITSE 2020). С. 06006. (2020).

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

DOI: 10.24412/2074-5036-2021-2-18-25
УДК 619:578.835.2:615.371.004.12:616-076
Ключевые слова: титр вируса бешенства, антирабическая вакцина, пороговый цикл амплификации РНК, транскрипционная амплификация, beacon-технология
Key words: rabies virus titer, rabies vaccine, threshold cycle of RNA amplification, transcriptional amplification, beacon technology

Доронин М. И., Михалишин Д. В., Мудрак Н. С.

ОПОСРЕДОВАННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНФЕКЦИОННОГО ТИТРА ВИРУСА БЕШЕНСТВА В СЫРЬЕ ДЛЯ ВАКЦИН С ПРИМЕНЕНИЕМ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АМПЛИФИКАЦИИ И BEACON-ТЕХНОЛОГИИ

MEDIATED DETERMINATION OF INFECTIOUS TITER OF RABIES VIRUS IN RAW MATERIALS FOR VACCINES USING TRANSCRIPTION AMPLIFICATION AND BEACON-TECHNOLOGY

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»
Адрес: 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец
Federal Centre for Animal Health, Federal Governmental Budgetary Institution
Address: 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets

Доронин Максим Игоревич, к. б. н., вед. науч. сотрудник. E-mail:doronin@arriah.ru
Doronin Maksim Igorevich, PhD in Biological Science, Leading Researcher. E-mail:doronin@arriah.ru
Михалишин Дмитрий Валерьевич, к. в. н., зав. лабораторией. E-mail:mihalishindv@arriah.ru
Michalishin Dmitry Valerjevich, PhD in Veterinary Science, Head of the Laboratory. E-mail:mihalishindv@arriah.ru
Мудрак Наталья Станиславовна, главный научный сотрудник. E-mail: mudrak@arriah.ru
Mudrak Natalja Stanislavovna, Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher. E-mail: mudrak@arriah.ru

Аннотация. Бешенство – опасное для людей, а также диких и домашних плотоядных и сельскохозяйственных животных заболевание, характеризующееся признаками энцефаломиелита и абсолютной летальностью. Для профилактики рабической болезни проводят ряд мер, одной из которых является иммунизация животных. В статье представлен новый подход к опосредованному определению инфекционного титра вируса бешенства в неинактивированном сырье для вакцин с применением транскрипционной амплификации и beacon-технологии. В отличие от общепринятого метода титрования в клеточной линии с элементами реакции иммунофлуоресценции для определения титра вируса бешенства разработанный способ позволяет сократить время проведения анализа до 2–3 ч; исключить вероятность контаминации и субъективности при оценке результатов анализа; увеличить чистоту РНК вируса бешенства; увеличить специфичность и чувствительность анализа. Между инфекционным титром вируса бешенства и пороговым циклом реакции транскрипционной амплификации вирусной РНК с применением разработанных олигонуклеотидов установлена зависимость, отраженная в виде логарифмической функции $\lg T_{ВБ} = -0{,}2997 \times C_{t\ РНК} + 9{,}7524$ высокими достоверностью аппроксимации ($R^2 = 0{,}9997$) и эффективностью амплификации 98,41 %. Представленная математическая модель дает возможность определять значение инфекционного титра вируса бешенства в неинактивированном сырье для производства антирабических вакцин. По показателям вариации разработанный способ удовлетворял критериям приемлемости: коэффициент осцилляции составил 0,365–2,224 %, линейный коэффициент вариации – 0,045–0,185 %, коэффициент вариации – 0,059–0,179 %, что соответствует общепринятым нормам (Cδ<3 %).

Summary. *Rabies is a dangerous disease for humans, as well as for wild and domestic carnivores and farm animals, characterized by signs of encephalomyelitis and absolute mortality. A number of measures are carried out for the prevention of slave disease, one of which is the immunization of animals. The article presents a new approach to the indirect determination of the infectious titer of the rabies virus in non-inactivated raw materials for vaccines using transcriptional amplification and beacon technology. In contrast to the generally accepted method of titration in a cell line with elements of the reaction of immunofluorescence for determining the titer of the rabies virus, the developed method allows to reduce the analysis time to 2–3 hours; eliminate the likelihood of contamination and subjectivity when evaluating the results of the analysis; increase the purity of rabies virus RNA; increase the specificity and sensitivity of the assay. A relationship was established between the infectious titer of the rabies virus and the threshold cycle of the reaction of transcriptional amplification of viral RNA using the developed oligonucleotides, reflected in the form of the logarithmic function* $\log T_{RV} = -0.2997 \times C_{t\ RNA} + 9.7524$ *with high accuracy of approximation* ($R^2 = 0.9997$) *and the amplification*

avvb_2021_02.indd 18 26.06.2021 20:37:00

efficiency is 98.41 %. The presented mathematical model makes it possible to determine the value of the infectious titer of the rabies virus in non-inactivated raw materials for the production of rabies vaccines. In terms of variation indicators, the developed method met the acceptance criteria: the oscillation coefficient was 0.365–2.224 %, the linear coefficient of variation was 0.045–0.185 %, and the coefficient of variation was 0.059–0.179 %, which corresponds to generally accepted standards (Cδ <3 %).

Введение

В настоящее время в мире продолжают регистрировать бешенство у людей, а также у домашних и диких плотоядных и сельскохозяйственных животных. Болезнь, характеризующаяся признаками энцефаломиелита и абсолютной летальностью. Классический возбудитель бешенства *Rabies virus* (RABV) является РНК-содержащим вирусом, принадлежащий реалму *Riboviria* царству *Orthornavirae* типу *Negarnaviricota* классу *Monjiviricetes* порядку *Mononegavirales* семейству *Rhabdoviridae* роду *Lyssavirus* (*Rabies lyssa virus*) генотипу *Rabies virus* (RABV) [4].

Вирионы вируса бешенства имеют пулевидную форму длиной 100–300 нм, диаметром 45–100 нм. На наружной поверхности вирусной частицы располагаются выступы в виде шипов длиной 10–12 нм, которые прикреплены к двуслойной липидной оболочке [2]. Геном RABV составляет около 12 000 нуклеотидных оснований (н. о.) и включает 5 последовательно расположенных генов 3'-N-P-M-G-L-5', кодирующих 5 белков: N – нуклеопротеин, G – гликопротеин, P – фосфопротеин, M – матриксный белок, L – РНК-зависимую РНК-полимеразу. Гены разделены некодирующими областями. Наиболее консервативным является N-ген, а наибольшие изменения, происходящие в геноме изолятов и штаммов вируса бешенства, отмечаются в G-гене [1, 4].

Рабическая инфекция приводит к значительным экономическим потерям, которые связаны с гибелью людей, падежом сельскохозяйственных животных, ликвидацией последствий вспышек заболевания, проведением профилактических и карантинных мероприятий, регулированием численности диких плотоядных животных, отловом бродячих кошек и собак и осуществлением лабораторно-диагностических исследований. Система мер по борьбе и профилактике бешенства предусматривает иммунизацию домашних, сельскохозяйственных и диких плотоядных, а также контроль уровня напряженности поствакцинального иммунитета [4].

Иммунизацию домашних и сельскохозяйственных целевых животных проводят с применением инактивированных антирабических вакцин. При изготовлении вакцин против бешенства вирусосодержащую суспензию исследуют на определение инфекционного титра вируса для оценки его активности в клетках. В 1,0 см^3 суспензии вируса бешенства определяют количество клеточных культуральных инфекционных доз, вызывающих 50 %-ное поражение клеток (ККИД$_{50}$/см^3), что фактически отражает концентрацию полных вирусных частиц, содержащих РНК.

Определение значения инфекционного титра вируса бешенства в соответствии с рекомендациями международного стандарта OIE [4] проводят методом титрования в монослойной клеточной линии почки новорожденного сирийского хомячка BHK-21 с последующим окрашиванием монослоя конъюгатом (суспензия специфического иммуноглобулина G, меченого флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ)) (Реакция иммунофлуоресценции – РИФ). Данный метод зарекомендовал себя, однако он имеет некоторые недостатки, а именно: длительная процедура анализа (не менее 3 суток), связанная с репродукцией вируса в клетках; определенная степень субъективности при оценке результатов исследования; высокая стоимость клеточной линии как тест-системы и затраты на ее поддержание; высокая вероятность риска контаминации клеточной линии; качество конъюгата [1].

В связи с этим целесообразно разработать способ определения инфекционного титра вируса бешенства в неинактивированном сырье для вакцины на основе транскрипционной амплификации и с применением beacon-технологии.

avvb_2021_02.indd 19 26.06.2021 20:37:00

Молекулярно-биологический метод транскрипционной амплификации с применением beacon-технологии является объективным, высокочувствительным и высокоспецифичным, более дешевым по сравнению с методом титрования в культуре клеток, характеризуется применением стандартизированных компонентов реакции, не создает ситуаций риска контаминации, поскольку пробирки закрыты на этапе детекции результатов анализа, отличается высокими значениями правильности и позволяет определять инфекционный титр вируса бешенства в неинактивированных вирусосодержащих суспензиях в течение 2–3 часов.

В настоящее время представленный метод применяют только для качественного выявления некоторых инфекционных агентов, в частности, возбудителя аспергиллеза, гриппа птиц А, энтеровирусной инфекции, микобактериоза КРС, парагриппа-1, 2, 3, 4, сальмонеллеза животных [10]. Для количественного определения вирусной нагрузки суспензии, в частности, для опосредованного определения титра вируса бешенства ранее данный метод не применялся.

Цель исследования заключалась в разработке высокочувствительного и высокоспецифичного способа опосредованного определения инфекционного титра вируса бешенства в сырье для вакцин с применением транскрипционной амплификации и beacon-технологии.

Материалы и методы

Вирус. В работе использовали классический вирус бешенства штаммов РВ-97 и ВНИИЗЖ, которые являются производственными и депонированы в Коллекции штаммов микроорганизмов (КШМ) ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Титрование вируса бешенства проводили в монослойной перевиваемой культуре клеток ВНК-21 с последующим окрашиванием конъюгатом по общепринятой методике [1, 4].

Выделение РНК вируса бешенства осуществляли с применением магнитных частиц оксида железа (II, III) диаметром 300–320 нм в присутствии хаотропного денатурирующего агента 4 М раствора гуанидинизотиоцианата (ГТЦ). Освобождение магнитных частиц от белковых фракций и липопротеинов проводили с использованием 40 и 70 %-ных растворов изопропилового спирта, а также 80 %-ного раствора диметилкетона. Элюирование РНК осуществляли с помощью деионизированной воды, свободной от РНКаз.

Для оценки степени чистоты элюата РНК проводили измерения спектральной поглощающей способности образцов при длинах волны в диапазоне 205–325 нм. Интерпретация возможных результатов описана ранее [2].

Определение температуры плавления олигонуклеотидов, применяемых для транскрипционной амплификации проводили с использованием двух методов. Первый – метод, учитывающий концентрации ионов K^+ и диметилсульфооксида (DMSO) с стандартным применением формулы [6]:

$$T_m = 77.1 + 11.7\lg[K^+] + \frac{41(G+C) - 528}{L} - 0.75[\%DMSO]$$

где $[K^+]$ – концентрация ионов калия (М), [% DMSO] – количество диметилсульфооксида (%), G – количество остатков рибогуанозинтрифосфата, C – количество остатков рибоцитидинтрифосфата.

Второй – метод ближайших соседей с применением расчетной формулы [6]:

$$T_m = \frac{dH \cdot 1000}{dS + R\ln(\frac{C}{4}) + 0.386(L-1)\ln([K^+])} - 273.15$$

где dH – дифференциал энтропии (ккал/моль), dG – дифференциал энергии Гиббса (ккал/моль), dS – дифференциал энтальпии (кал/°К·моль), C – концентрация олигонуклеотида ($2 \cdot 10^{-7}$ М), L – длина олигонуклеотида, $[K^+]$ – концентрация ионов калия ($5 \cdot 10^{-2}$ М), R – газовая постоянная (1,987 кал/К·моль).

Реакция транскрипционной амплификации. Для проведения транскрипционной амплификации использовали разработанные нами оригинальные олигонуклеотидные праймеры и зонд в концентрации 0,20 пМ на реакцию. Для синтеза нуклеотидных цепей РНК-ампликонов применяли дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dNTP) и рибонуклеозидтрифосфаты (NTP) с их концентрацией в реакционной смеси по 2 мМ. Для реакции

avvb_2021_02.indd 20 26.06.2021 20:37:00

также использовали буферный раствор (5х), включающий в свой состав ионы калия (K^+) ($5 \cdot 10^{-2}$ М) и диметилсульфооксид (DMSO) (1 %). В качестве кофактора применяли 12 мМ хлорида магния. В качестве катализаторов реакции использовали следующие ферменты: AMV-обратную транскриптазу (10 ед.), РНКаза Н *E. coli* (10 ед.) и Т7 ДНК-зависимую РНК-полимеразу (10 ед.). Данные ферменты добавляли в реакционную смесь после прогревания до 65 ºС и снижения температуры до 41 ºС, поскольку эти компоненты реакции термолабильны. Элюаты РНК вируса бешенства вносили к реакционной смеси в соотношении 1/5.

Постановку реакции осуществляли в детектирующем амплификаторе. Стадию денатурации РНК проводили при температуре 65 °С в течение 5 мин за 1 цикл. Реакцию транскрипционной амплификации осуществляли в течение 35 циклов в изотермических условиях при температуре 41 ºС в течение 105 минут. Каждый условный цикл длится 3 минуты и складывался из 7 подэтапов: отжиг Oligo-RNA-RabV-N-P1 на вирусной РНК, элонгация комплементарной ДНК (кДНК), разрушение гибрида РНК/кДНК, отжиг Downstream-RNA-RabV-N-P2, элонгация второй цепи кДНК, активация промотора Т7 ДНК-зависимой РНК-полимеразы, синтез вирусной РНК, отжиг RNA-RabV-N-FAM/RHQ1-beacon (рис. 1).

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка заключалась в определении средних арифметических значений и достоверности статистической разницы между средними величинами, определенными по разностному методу Стьюдента-Фишера [9]. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p<0,005$.

Результаты исследований и обсуждение

На первом этапе исследования проводили расчет олигонуклеотидов для постановки реакции транскрипционной амплификации с beacon-технологией на основании нуклеотидных последовательностей N-гена вируса бешенства применяемых производственных штаммов РВ-97 и ВНИИЗЖ.

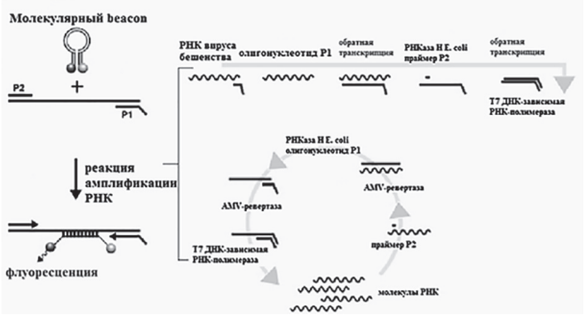

Рис. 1. Этапы реакции транскрипционной амплификации с применением beacon-технологии

В качестве гомологичных N-гену вируса бешенства используют следующие олигонуклеотиды: Oligo-RNA-RabV-N-P1 (5'-AAT-TCT-AAT-ACG-ACT-CAC-TAT-AGG-G-CGU-GGA-GCA-CCA-UAC-UCU-AAG-AA-3') (курсивом обозначена 5'-промоторная часть фермента Т7 ДНК-зависимой РНК-полимеразы), Downstream-RNA-RabV-N-P2 (5'-GGC-UGG-UAU-CGU-UUA-CUG-GGU-AA-3') и RNA-RabV-N-FAM/RHQ1-beacon (5'-FAM-GUG-UGC-UAA-UUG-GAG UAC-UAU-ACC-GAA-RHQ1-3'). Олигонуклеотиды были очищены в полиакриламидном геле и с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Олигонуклеотиды для РНК-матрицы подбирали в соответствии с рядом общих требований [5]. Длины Oligo-RNA-RabV-N-P1 (гибридной части), Downstream-RNA-RabV-N-P2 и RNA-RabV-N-FAM/RHQ1-beacon составляют 23, 23 и 24 н.о., что соответствует требованиям (20-30 н.о.) [5]. Молекулярный вес прямого, обратного праймеров и beacon равен 7574,5; 7602,4 и 8966,6, соответственно, а процентное содержание G и C в них составляет 48; 48 и 46 %, соответственно, что допустимо (40–60%) [5]. На 3'-конце олигонуклеотидных праймеров располагается полиадениловый фрагмент (A_n). Гибридная часть молекулярного beacon не комплементарна олигонуклеотидным праймерам. Отсутствуют 4 и более подряд одинаковых нуклеотидов в цепи олигонуклеотидов. В beacon располагается по 6 нуклеотидов с двух сторон, комплементарных друг другу, что требуется для формирования «стеблевой» части. В качестве флуоресцентного красителя был выбран N-гидроксисукцинимидный эфир 5/6 FAM

avvb_2021_02.indd 21 26.06.2021 20:37:00

(5/6 карбоксифлуоресцеин, смесь изомеров) с длиной волны с максимальной флуоресценцией 520 нм, который присоединен к beacon с помощью реакционной аминогруппы концевого нуклеотида. Для тушения свечения использовали гаситель флуоресценции RHQ1 с длиной волны максимального поглощения при 520 нм и возможном диапазоне гашения 470–570 нм. Таким образом, была предложена подходящая пара «флуорофор-гаситель». Флуорофор присоединен к 5'-концу, а гаситель флуоресценции – к 3'-концу.

При анализе нуклеотидных последовательностей гибридизационной части установили, что для олигонуклеотидов не характерно образование «шпилек» (за исключением «стеблевой» части бикона), а также не выявлено 3'-комплементарности и сайтов, отжигающих сами на себя при условии, когда минимальное количество пар оснований, необходимое для димеризации праймера и минимальное количество пар оснований, необходимое для образования шпильки – 4 [8].

Проведено определение температур плавления (T_m) для гибридизационной части олигонуклеотидов. Точное определение температуры плавления играет очень важную роль в молекулярно-биологических исследованиях, в том числе при подборе РНК-праймеров и бикона для реакции транскрипционной амплификации РНК вируса бешенства. В соответствии с требованиями к реакции амплификации с последующей детекцией РНК-ампликонов с помощью beacon-технологии температура плавления олигонуклеотидов (гибридной их части) должна быть выше температуры реакции (41 ºС) не менее чем на 7–10 ºС.

Определены физические, термодинамические константы и проведен расчет температур плавления разработанных олигонуклеотидных РНК-праймеров и beacon. Выявлено, что энтропия, энергия Гиббса и энтальпия для Oligo-RNA-RabV-N-P1 составили 235,42 ккал/моль, 29,5 ккал/моль, 609,8 кал/(ºК·моль), соответственно. Энтропия, энергия Гиббса и энтальпия для Downstream-RNA-RabV-N-P2 составили 231,81 ккал/моль, 29,6 ккал/моль, 598,1 кал/(ºК·моль). Энтропия, энергия Гиббса и энтальпия для RNA-RabV-N-FAM/RHQ1-beacon составили 232,98 ккал/моль, 31,8 ккал/моль, 606,1 кал/(ºК·моль), соответственно. Данные значения были необходимы для расчета температур плавления представленных олигонуклеотидов. T_m при использовании алгоритма ближайших соседей для Oligo-RNA-RabV-N-P1, Downstream-RNA-RabV-N-P2 и RNA-RabV-N-FAM/RHQ1-beacon составили 66, 67 и 64 ºС, соответственно, что ниже более чем на 7–10 ºС, чем температура амплификации РНК, (41 ºС) и соответствует общепринятым требованиям, предъявляемым к олигонуклеотидам, используемым для данной реакции [6].

При использовании более простого метода, учитывающего концентрации ионов K^+ и диметилсульфооксида (DMSO) [5] T_m для Oligo-RNA-RabV-N-P1, Downstream-RNA-RabV-N-P2 и RNA-RabV-N-FAM/RHQ1-beacon составили 51 ºС для всех олигонуклеотидов, что на 10 ºС выше, чем температура амплификации РНК (41 ºС) и также соответствует общепринятым требованиям, предъявляемым к олигонуклеотидам, используемым для данной реакции [5].

Последовательности разработанных оригинальных олигонуклеотидов были исследованы на наличие нежелательных совпадений с другими последовательностями нуклеиновых кислот с использованием Банка данных последовательности РНК [3]. Последовательности праймеров также проанализировали на наличие внутренних вторичных структур с помощью программы сворачивания нуклеиновых кислот с помощью программы Mfold [11]. Было выявлено, что для разработанных олигонуклеотидов нежелательных совпадений с другими последовательностями нуклеиновых кислот, а также наличия внутренних вторичных структур не обнаружено.

Таким образом, определены дизайн и температура плавления олигонуклеотидных праймеров и молекулярного beacon на основании нуклеотидных последовательностей N-гена вируса бешенства вакцинных штаммов РВ-97 и ВНИИЗЖ.

На следующем этапе исследования проводили выражение функции зависимости инфекционного титра вируса бешенства в неинактивированном сырье для антираби-

avvb_2021_02.indd 22 26.06.2021 20:37:01

ческих вакцин и порогового цикла реакции транскрипционной амплификации вирусной РНК в виде математической модели.

Для определения значения инфекционного титра вируса бешенства штамма РВ-97 подготавливали серию разведений положительных стандартных образцов вируса бешенства, в качестве которых применяли неинактивированные суспензии вируса бешенства с титрами: 0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 lg ККИД$_{50}$/см^3. Репродукция вируса проводилась в суспензионной клеточной линии почки новорожденного сирийского хомячка ВНК-21. Отрицательным контролем служила суспензия клеток ВНК-21, не зараженная вирусом бешенства, с концентрацией 2,5-3,0 млн кл./см^3.

На следующем этапе исследования с помощью спектрального сканирования в излучении ультрафиолетового света проводили оценку степени чистоты полученных элюатов РНК вируса бешенства штамма РВ-97 из разведений стандарта. Образцы РНК сканировали в кварцевых кюветах (l=10 мм) при температуре 23–25 °С и регистрировали значения экстинкции в диапазоне от 205 до 325 нм через каждые 2 нм, производя запись спектра поглощения РНК с помощью сервиса Specrtrum v. 5.0.

Обнаружили, что значения OD205-259 и OD261-325 не превышают OD260, что является признаком высокой степени чистоты полученных элюатов РНК (n=3). Из данных спектрального исследования положительных стандартов отмечали отсутствие выраженных пиков на графиках (рис. 2) при длинах волны 205, 235, 270, 280 и 320 нм, что свидетельствовало о практически полном отсутствии загрязнения элюатов РНК примесями фосфолипидов, полисахаридов и остатков ГТЦ, полипептидов и крупных конгломератов, соответственно. Значения коэффициента экстинкции R^1 для положительных стандартов составляли норму 2,000, что подтверждало отсутствие ДНК и наличие лишь следовых количеств примесей полипептидов. Деградации нуклеиновой кислоты и наличия свободных нуклеотидов в элюатах не отмечалось. Экстракты вирусной РНК не загрязнены полисахаридами и остатками ГТЦ,

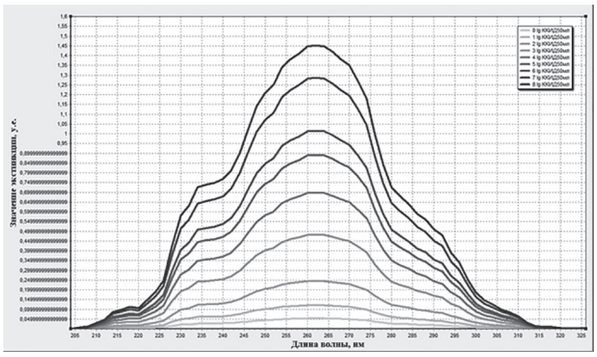

Рис. 2. Спектральный анализ элюатов РНК, выделенных из стандартов суспензий вируса бешенства с разными титрами

так как значения коэффициента экстинкции R^2 приближены к норме 2,000 и соответствовали 2,000–2,005. С помощью спектрального анализа разрушения РНК в экстрактах не обнаружено [7]. Таким образом, экстракты РНК вируса ящура, выделенные из стандартов, характеризовались высокой степенью чистоты.

После оценки степени чистоты элюатов проводили реакцию транскрипционной амплификации РНК вируса бешенства как описано выше. Получены данные реакции амплификации РНК, которые анализировали, оценивая и сравнивая графики накопления флуоресцентного сигнала по значениям пороговых циклов амплификации РНК $C_{t\ РНК}$, определенных с помощью пересечения пороговой линии и логарифмическим отображением функции $Fl = f(C_{t\ РНК})$. Устанавливали зависимость между пороговым циклом амплификации РНК и инфекционным титром вируса бешенства в неинактивированном сырье для антирабических вакцин. Полученные результаты отражены на рис. 3 и выражены в виде логарифмической функции: $\lg_{ТВБ} = -0{,}2997 \times C_{t\ РНК} + 9{,}7524$. Оценивали величину эффективности реакции амплификации (E) по формуле: $E=1-10^{-1/k}$ (k из функции $C_{t\ РНК} = -3{,}3361 \times \lg_{ТВБ} + 32{,}51$), а также достоверность аппроксимации (R^2). Эффективность реакции транскрипционной амплификации РНК составила 99,41 %, достоверность аппроксимации – 0,9997, что соответствовало общепринятым требованиям, предъявляемым к реакциям амплификации [5, 11].

На заключительном этапе анализа проводили тестирование разработанного способа

avvb_2021_02.indd 23 26.06.2021 20:37:01

для определения титра вируса бешенства вакцинных штаммов РВ-97 и ВНИИЗЖ в 400 неинактивированных суспензиях с инфекционными титрами от 8,00 до 1,00 lg ККИД$_{50}$/см^3. Исследования параллельно проводили в РИФ [4] в трех повторениях. Выявили, что данные, полученные с помощью разработанного способа, коррелировали с методом РИФ на 99,6–100 % для 8,00–7,00 lg ККИД$_{50}$/см^3 (n=80), на 98,0–99,6 % для 6,99–4,00 lg ККИД$_{50}$/см^3 (n=80), на 97,0–98,0 % для 3,99–3,00 lg ККИД$_{50}$/см^3 (n=80), на 95,8–97,0 % для 2,99–2,00 lg ККИД$_{50}$/см^3 (n=80), на 93,0–95,8 % для 1,99–1,00 lg ККИД$_{50}$/см^3 (n=80). При сравнении с данными метода РИФ совпадение фактических и ожидаемых результатов соответствовало значениям 93,0–100,0 %. Для положительного контроля совпадение фактических и ожидаемых результатов составило 99,8 %. В отрицательном контрольном образце геном и полные частицы вируса бешенства не обнаружены, что также соответствовало ожиданиям.

Чувствительность способа составила 99,31 % (n=422), специфичность – 100,00 % (n=422), общая точность – 99,66 % (n=422). Для определения прецизионности представленного способа в условиях воспроизводимости суспензии вируса бешенства исследовали два оператора в разное время в 25 повторностях. Для генеральной совокупности значений C_t размах вариации составил 0,06–0,44, среднее линейное отклонение находилось в диапазоне 0,008–0,052, т.е. степень колеблемости в выборках относительно среднего уровня признака низкая. Дисперсия

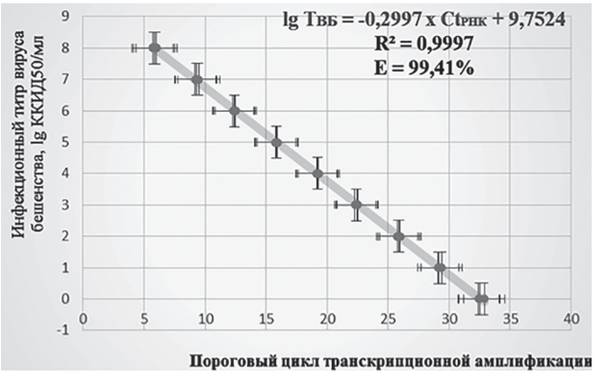

Рис. 3. Математическая модель для опосредованного расчета титра инфекционной активности вируса бешенства в сырье для вакцин

составила 0,001–0,006, среднее квадратичное отклонение – 0,011–0,089, что подтверждает незначительную степень отклонений индивидуальных значений C_t от среднего арифметического и высокий уровень достоверности данных внутри каждой выборки. Коэффициент осцилляции составил 0,365–2,224 %, линейный коэффициент вариации – 0,045–0,185 %, коэффициент вариации – 0,059–0,179 %, что соответствует общепринятым нормам (Cδ<3 %) [9]. Относительное изменение крайних значений Ct и доля среднего показателя абсолютных отклонений в сравнении со средним внутри каждой совокупности незначительна. По показателям вариации разработанный способ удовлетворял критериям приемлемости [9].

Заключение

Предложен новый подход к опосредованному определению инфекционного титра вируса бешенства в сырье для вакцин с применением транскрипционной амплификации и beacon-технологии, который позволяет сократить время проведения анализа неинактивированных вирусосодержащих суспензий до 2–3 ч; исключить вероятность контаминации и субъективности при оценке результатов анализа; увеличить чистоту РНК вируса бешенства; увеличить специфичность и чувствительность анализа.

Выявлено, что чувствительность способа составила 99,31 % (n=422), специфичность – 100,00 % (n=422), общая точность – 99,66 % (n=422). Проведено исследование прецизионности представленного способа в условиях воспроизводимости и определены незначительная степень отклонений индивидуальных значений порогового цикла амплификации РНК от среднего арифметического, а также высокий уровень достоверности данных внутри каждой выборки. Относительное изменение крайних значений C_t и доля среднего показателя абсолютных отклонений в сравнении со средним внутри каждой совокупности незначительна. Таким образом, подтверждена высокая степень прецизионности в условиях воспроизводимости, что позволяет применять разработанный способ для опосредованного определения инфекци-

avvb_2021_02.indd 24 26.06.2021 20:37:01

онного титра вируса бешенства в сырье для вакцин.

Исследование выполнено в рамках научного направления ФГБУ «ВНИИЗЖ» «Ветеринарное благополучие». Исследование выполнено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Груздев К. Н. Бешенство животных. / К. Н. Груздев, А. Е. Метлин. Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2019. 394 с.

2. Патент РФ № 2712769, 27.05.2019. Способ спектрометрического определения концентрации 146S частиц вируса ящура в неинактивированном сырье для вакцины по оценке количества молекул вирусной РНК, выделенной после иммунного захвата вирионов // Заявка № 2019116272. 2019, авт. Лозовой Д. А., Михалишин Д. В., Доронин М. И., Щербаков А. В., Тимина А. М., Шишкова А. А., Борисов А. В., Стариков В. А.

3. GenBank. [Электронный ресурс] / URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov. (Дата обращения: 02.12.2020).

4. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019 (OIE). Rabies. 2019. Ch. 3.1.17. P. 578–612.

5. Adams M. S. Thermodynamic characterization and nearest neighbor parameters for RNA duplexes under molecular crowding conditions / M. S. Adams, B. M. Znosko // Nucleic Acids Res. 2019. N. 23; 47(7). P. 3658–3666. doi: 10.1093/nar/gkz019.

6. SantaLucia J. Jr. The thermodynamics of DNA structural motifs / J. SantaLucia Jr., D. Hicks // Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure: journal. 2004. Vol. 33. P. 11–14. doi: 10.1146/annurev.biophys.32.110601.141800

7. The Analysis of DNA or RNA using Its Wavelengths: 230 nm, 260 nm, 280 nm. Bioteachnology.com [Электронный ресурс] / URL: http://bioteachnology.com/dna/analysis-dna-rna-wavelengths-230-260-280-nm. (Дата обращения 04.12.2020).

8. The RNA Institute college of arts and science university at Albany. The mfold Web Server. RNA Folding Form. [Электронный ресурс] / URL: http://bioinfo.math.rpi.edu/~mfold/dna/form1.cgi (Дата обращения: 21.12.2020).

9. Vallat B. OIE Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases. 2nd ed. Paris, France, 2008. 67 p.

10. Yue Y. Application of NASBA and RPA in detection of pathogenic bacteria / Y. Yue, J. Z. Zhang, M. J. Zhang // Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. 2019. N. 10; 40(8). P. 1018–1022. doi: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2019.08.027.

11. Wang Y. The nearest neighbor and next nearest neighbor effects on the thermodynamic and kinetic properties of RNA base pair / Y. Wang, Z. Wang, Y. Wang, T. Liu, W. Zhang // J. Chem Phys. 2018. N. 28;148(4):045101. doi: 10.1063/1.5013282.

DOI: 10.24412/2074-5036-2021-2-25-34
УДК 619:578.824.11:615.371:573.6
Ключевые слова: вирус бешенства, антирабическая вакцина, полнота инактивации антигена, полимеразная цепная реакция.
Key words: rabies virus, rabies vaccine, completeness of antigen inactivation, polymerase chain reaction.

Доронин М. И., Михалишин Д. В., Борисов А. В., Мудрак Н. С., Михалишин В. В.

ОПОСРЕДОВАННЫЙ КОНТРОЛЬ ПОЛНОТЫ ИНАКТИВАЦИИ АНТИГЕНА ВИРУСА БЕШЕНСТВА ДЛЯ АНТИРАБИЧЕСКИХ ВАКЦИН С ПРИМЕНЕНИЕМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

MEDIATED CONTROL OF THE COMPLETENESS OF INACTIVATION OF ANTIGEN OF THE RABIES VIRUS FOR RABIES VACCINES USING A POLYMERASE CHAIN REACTION

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»
Адрес: 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец
Federal Centre for Animal Health, Federal Governmental Budgetary Institution
Address: 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets

Доронин Максим Игоревич, к. б. н., вед. науч. сотрудник. E-mail:doronin@arriah.ru
Doronin Maksim Igorevich, PhD in Biological Science, Leading Researcher. E-mail:doronin@arriah.ru
Михалишин Дмитрий Валерьевич, к. в. н., зав. лабораторией. E-mail:mihalishindv@arriah.ru
Michalishin Dmitry Valerjevich, PhD in Veterinary Science, Head of the Laboratory. E-mail:mihalishindv@arriah.ru

avvb_2021_02.indd 25 26.06.2021 20:37:01

Борисов Алексей Валерьевич, к.в.н., вед. науч. сотрудник. E-mail: borisov_av@arriah.ru
Borisol Aleksei Valerjevich, PhD in Veterinary Science, Leading Researcher. E-mail:borisov_av@arriah.ru
Мудрак Наталья Станиславовна, главный научный сотрудник. E-mail: mudrak@arriah.ru
Mudrak Natalja Stanislavovna, Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher. E-mail: mudrak@arriah.ru
Михалишин Валерий Васильевич, профессор, доктор ветеринарных наук, эксперт. E-mail: mihalishin@arriah.ru
Michalishin Valery Vasiljevich, Professor, Doctor of Veterinary Science, Expert. E-mail:mihalishin@arriah.ru

Аннотация. Бешенство занимает первоочередное место среди вирусных болезней человека и животных, является одним из сверхопасных зоонозов с неизбежным летальным исходом. Рабической болезни уделяют огромное внимание международные организации (ВОЗ, МЭБ, ФАО, GARC) и ветеринарные службы многих стран мира. Важной мерой по борьбе с бешенством является иммунизация животных. Для этих целей в ветеринарии зачастую применяют инактивированные антирабические вакцины. Технология изготовления таких препаратов обязательно предусматривает проведение исследования на отсутствие вирулентного вируса бешенства в конечном продукте. В статье представлены сведения по разработке и тестированию способа опосредованного контроля полноты инактивации антигена вируса бешенства с применением обратно-транскриптазной полимеразной цепной реакции. Предлагается применение оптимизированной реакции амплификации с использованием системы оригинальных праймеров N-F и L9989-R, детектирующих протяженный участок в N-, P-, M-, G-, L-генах вируса бешенства размером 9986 п. н. С помощью данного метода выявляется наличие неповрежденной нуклеиновой кислоты вируса бешенства до процесса инактивации и ее отсутствие после воздействия инактивантами. Наличие продуктов ПЦР опосредованно свидетельствует о сохранении нуклеиновой кислоты вируса без повреждения и, как следствие, о наличии вирулентности, а отсутствие ампликонов указанного размера – о повреждении РНК и потере вирулентных свойств вирусной частицы. Показана возможность одновременного исследования большого количества проб для определения полноты инактивации антигена вируса бешенства в сырье для антирабической инактивированой вакцины в течение 5 ч. Разработанный способ позволяет с высокой степенью достоверности исследовать полноту инактивации антигена вируса бешенства. Чувствительность способа составляет 99,36 %, специфичность – 100,00 %, общая точность – 99,68 %.

Summary. *Rabies occupies the first place among viral diseases of humans and animals, it is one of the most dangerous zoonoses with an inevitable fatal outcome. International organizations (WHO, OIE, FAO, GARC) and veterinary services in many countries of the world pay great attention to rabies. Immunization of domestic, agricultural and wild carnivores is an important measure in the fight against rabies. For these purposes, inactivated rabies vaccines are often used in veterinary medicine. The technology for the manufacture of such drugs necessarily provides for a study for the absence of virulent rabies virus in the raw material for the vaccine. The article presents information on the development and testing of a method for indirect control of the completeness of rabies virus antigen inactivation using reverse transcriptase polymerase chain reaction followed by electrophoresis of amplicons in agarose gel. It is proposed to employ an optimized amplification reaction using a system of original primers N-F and L9989-R, detecting an extended region in the N-, P-, M-, G-, L-genes of the rabies virus with a size of 9986 bp. Using this method, it is possible to detect intact rabies virus nucleic acid before the inactivation process and its absence after exposure to inactivants. The presence of PCR products indirectly indicates the preservation of the virus nucleic acid without damage and, as a consequence, the presence of virulence, and the absence of amplicons of the specified size indicates damage to the RNA and the loss of the virulent properties of the viral particle. The possibility of simultaneous study of a large number of samples to determine the completeness of inactivation of the antigen of the rabies virus in the raw material for the inactivated rabies vaccine within 5 hours is shown. The developed method allows to determine with a high degree of reliability the completeness of inactivation of the antigen of the rabies virus. The sensitivity of the method is 99.36 %, the specificity is 100.00 %, and the overall accuracy is 99.68 %.*

Введение

Вспышки бешенства в мире продолжают фиксировать в различных точках земного шара. Возбудителем рабической болезни является вирус бешенства, который принадлежит порядку *Mononegavirales*, семейству *Rhabdoviridae*, роду *Lyssavirus*, виду *Rabies lyssavirus* [3]. Геном вируса представлен несегментированной одноцепочечной негативной спиральной молекулой РНК длиной около 12 000 н. о., который кодирует 5 основных белков: нуклеопротеин (N-белок), фосфопротеин (P-белок), матриксный белок (M-белок), гликопротеин (G-белок), РНК-зависимую РНК-полимеразу (L-белок). Между G- и L-цистронами располагается псевдоген (ψ-фрагмент) (Faber, 2005). Размеры N-, P-, M-, G-, ψ- и L-генов в среднем составляют 1420, 990, 610, 1675, 525, 6475 н. о., соответственно [1, 4].

Экономические потери, которые возникают по причине бешенства, в мире оценивают на уровне около 6,7 млрд евро в год [4]. Комплексный подход по профилактике рабиче-

avvb_2021_02.indd 26 26.06.2021 20:37:01

ской болезни предполагает в качестве доминирующей меры иммунизацию домашних, сельскохозяйственных и диких плотоядных животных, а также исследование уровня напряженности поствакцинального гуморального иммунитета [1]. Для формирования защитного иммунитета у животных применяют различные антирабические вакцины, в том числе культуральные инактивированные препараты, которые зарекомендовали себя в России и в мире. Для домашних плотоядных и сельскохозяйственных животных в России используют инактивированные вакцины из различных штаммов вируса бешенства, в том числе ВНИИЗЖ.

Технология изготовления антирабических инактивированных вакцин ветеринарного назначения обязательно предусматривает проведение исследования на отсутствие вирулентного вируса бешенства в сырье [11, 13]. В соответствии с требованиями Всемирной организации по охране здоровья животных при производстве антирабических вакцин для получения инактивированного антигена применяют инактиванты первого порядка, а именно β-пропиолактон (БПЛ), 1,2-аминоэтилэтиленимин (АЭЭИ) [1, 2, 11].

β-пропиолактон является внутренним циклическим эфиром β-оксипропионовой кислоты с высокой реактогенностью. БПЛ, электрофил по своей природе, взаимодействует с нуклеиновой кислотой вируса по оксиметиленовому углероду [14], что вызывает частичную деградацию вирусной РНК и, тем самым, утрачивается вирулентность возбудителя бешенства. В то же время антигенные свойства вирусных частиц сохраняются.

АЭЭИ – циклический амин, который вступает в реакцию замещения водорода в N-H-связи вирусной РНК с сохранением цикла инактиванта. Данный процесс приводит к деградации нуклеиновой кислоты вируса, а также формированию соединений, подобных 7-(2-аминоэтил) гуанидину [10], в результате этого утрачивается вирулентность возбудителя, но при этом сохраняется антигенные свойства частицы вируса.

Представленные инактиванты I порядка вызывают потерю инфекционных свойств вируса бешенства за счет многочисленных делеций и повреждений вирусной РНК, присоединение новых функциональных групп к нуклеотидам, и даже разрушения вирусного генома до низкомолекулярных фрагментов [2, 5, 10, 14]. В результате процессы обратной транскрипции, трансляции и процессинга белков вируса и, как следствие, репродукции и сборки вириона in vivo и in vitro становятся невозможными. Разрывы в N-, P-, M-, G-генах приводят к прекращению процесса синтеза важнейших белков вируса бешенства. Разрушения РНК в L-гене делает невозможным синтез фермента РНК-зависимой-ДНК-полимеразы, иными словами, не осуществляется репликация нуклеиновой кислоты вируса и, как следствие, воспроизводство вирионов [1]. Таким образом, при одном из указанных повреждений вирус бешенства утрачивает свои вирулентные свойства. Этот феномен можно определить с помощью молекулярно-биологического исследования.

Полноту инактивации верифицируют с использованием теста на остаточное содержание вирулентного вируса бешенства в чувствительной клеточной линии почки новорожденного сирийского хомячка ВНК-21 с применением реакции иммунофлуоресценции (РИФ) [11]. Существенными недостатками указанного метода являются: длительная процедура анализа, связанная с репродукцией вируса (не менее 4 суток для каждого из трех пассажей); субъективность при оценке результатов исследования; высокая стоимость культуры клеток и затраты на ее поддержание. В связи с этим целесообразно разработать способ контроля полноты инактивации антигена вируса бешенства с применением молекулярно-биологического исследования, который является более быстрым, менее затратным методом и отличается при этом высокой степенью надежности. Так, для определения остаточной вирулентности вирусов классической чумы свиней, инфекционного бронхита кур, эховирусов и др. в последние годы стали применять обратно-транскриптазную полимеразную цепную реакцию (ОТ-ПЦР) с последующей детекцией продуктов реакции с помощью горизонтального электрофореза,

avvb_2021_02.indd 27 26.06.2021 20:37:01

а также биофизический метод с применением рестрикционного и электрофоретического анализа (Закутский Н. И., Луницин А. В., 2016) [5]. Для контроля полноты инактивации антигена вируса бешенства в вирионных вакцинах данный метод ранее не применялся. Для работы с РНК-содержащим вирусом бешенства было решено взять за основу ОТ-ПЦР [6, 8, 9].

В настоящее время данный метод применяют только для проведения диагностики рабической болезни, типирования и молекулярно-эпидемиологических исследований вируса бешенства, а также для дифференциации штаммов с применением штаммоспецифических праймеров (Tordo et al., 1995, 1996; Цыбанов с соавт., 2002; David et al., 2002; Rimhanen-Finne et al., 2010; Dacheux et al., 2010). Данный метод отличается высокой чувствительностью и специфичностью, объективностью анализа данных и быстротой проведения исследования. За счет оптимизации условий постановки анализа и разработке штаммоспецифичных оригинальных праймеров, позволяющих детектировать фрагменты большой длины, подборе необходимых контролей, можно проводить анализ степени повреждения вирусного генома и, как следствие, исследование полноты инактивации антигена вируса бешенства.

Цель исследования заключалась в разработке и тестировании высокочувствительного и высокоспецифичного способа опосредованного контроля полноты инактивации антигена вируса бешенства при производстве антирабических вакцин для ветеринарии с применением ОТ-ПЦР.

Материалы и методы

Контрольные образцы. При проведении контроля полноты инактивации антигена вируса бешенства использовали следующие контрольные образцы:

– $ПКО_{выд\text{-}е\ РНК}$ – положительный контрольный образец на этапе выделения РНК (исходный неинактивированный вирус бешенства);

– $ПКО_{ПЦР}$ – положительный контрольный образец на этапе ПЦР (проверенная комплементарная (кДНК) неинактивированного вируса бешенства);

– $ВКО_{выд\text{-}е\ РНК}$ – внутренний контрольный образец на этапе выделения РНК (исходный неинактивированный вирус ящура);

– $ВКО_{ПЦР}$ – внутренний контрольный образец на этапе ПЦР (проверенная кДНК неинактивированного вируса ящура);

– ОКО – отрицательный контрольный образец, контроль фона (деионизированная вода);

– $ОИКО_{выд\text{-}е\ РНК}$ – отрицательный инактивированный контрольный образец на этапе выделения РНК (инактивированная суспензия вируса бешенства);

– $ОИКО_{ПЦР}$ – отрицательный инактивированный контрольный образец на этапе ПЦР (проверенная кДНК вируса бешенства, выделенная из инактивированной суспензии).

Выделение РНК. На данном этапе использовали исследуемый материал, а также контроли $ПКО_{выд\text{-}е\ РНК}$, $ВКО_{выд\text{-}е\ РНК}$, $ОИКО_{выд\text{-}е\ РНК}$, ОКО. Для лизиса поверхностных белковых структур вируса бешенства использовали раствор, содержащий 50 % карболовой кислоты (pH<7,0) и 50 % 4М раствора гуанидинизотиоцананата. Фракционирование проводили с помощью хладона-20, 80 %-ного пропанола-2, 80 %-ного этанола и центрифугирования при 14 000 об/мин. Для работы отбирали верхнюю фракцию, представляющую собой экстракт РНК [7]. Элюирование РНК проводили в воде для молекулярно-биологических исследований.

Оценка степени чистоты экстрактов РНК. Степень чистоты выделенных элюатов РНК исследовали с помощью спектрального анализа по общепринятой методике [12].

Проведение ОТ-ПЦР. Для проведения реверсии РНК вируса бешенства готовили реакционную смесь с использованием набора реагентов для обратной транскрипции с гексамерами Applied Biosystems™ GeneAmp™. В качестве фермента использовали высокоточную ревертазу Maxima H Minus. Реакцию осуществляли при температуре 42 °С в течение 60 мин за 1 цикл. Полученную в реакции обратной транскрипции кДНК исследовали в реакции амплификации. На данном этапе в дополнение к контролям, которые применяли на стадиях выделения РНК и обратной транскрипции, использовали дополнитель-

avvb_2021_02.indd 28 26.06.2021 20:37:01

ные контроли: $ПКО_{ПЦР}$, $ВКО_{ПЦР}$, $ОИКО_{ПЦР}$. Для проведения реакции использовали оригинальные праймеры (дизайн представлен в разделе «Результаты исследований и обсуждение») в концентрации 20 пМ на реакцию, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты с концентрацией каждого в ПЦР-смеси по 0,25 мМ и хлорида магния – 3 мМ. В качестве катализатора реакции амплификации применяли высокоточную ДНК-полимеразу Platinum High Fidelity (2,5 ед.). Количество кДНК составляло 3/25 от объема реакционной смеси. Объем ПЦР-смеси компонентов вместе с кДНК для проведения одной реакции составлял 25 мкл.

Активацию ДНК-полимеразы проводили при температуре 94 °С за 180 с в течение 1 цикла. Реакцию амплификации осуществляли в течение 35 циклов, каждый из которых складывался из 3 подэтапов: «денатурация», проводимая при температуре 94 °С в течение 60 с, «отжиг праймеров» – при температуре 58 °С в течение 60 с, «элонгация» – при температуре 72 °С в течение 90 с. Финишную денатурацию осуществляли при температуре 72 °С в течение 180 с. Для постановки реакции использовали амплификатор Eppendorf Mastercycler GSX1 (или аналог). Суммарное время ОТ-ПЦР составляет 3 ч. 04 мин.

Детекцию ампликонов проводили с помощью горизонтального электрофореза в 1 %-м агарозном геле с применением 0,0005 % бромистого этидия, интеркалирущего между азотистыми основаниями ПЦР-продуктов.

Определение чувствительности, специфичности и общей точности метода. Чувствительность метода определяли по формуле: Ч = ДП/(ДП+ЛО), где Ч – диагностическая чувствительность, ДП – достоверноположительный результат, ЛО – ложноотрицательный результат. Специфичность метода определяли по формуле: Сп = ДО/(ДО+ЛП), где Сп – диагностическая специфичность, ДО – достоверноотрицательный результат, ЛП – ложноположительный результат. Общую точность теста определяли по формуле: Т = (ДП+ДО)/(ДП+ДО+ЛП+ЛО), где Т – общая точность, ДП – достоверноположительный результат, ДО – достоверноотрицательный результат, ЛП – ложноположительный результат, ЛО – ложноотрицательный результат.

Результаты исследований и обсуждение

На первом этапе работы проводили исследования по разработке способа контроля полноты инактивации антигена вируса бешенства при производстве антирабических вакцин для ветеринарии с применением ОТ-ПЦР. Для этого выделяли РНК вируса бешенства до и после процесса инактивации в соответствии с процедурой, описанной в разделе «Материалы и методы», исследовали степень чистоты полученных элюатов РНК спектральным методом; проводили синтез кДНК и реакцию амплификации, предполагающую использование системы оригинальных праймеров, детектирующих протяженный участок для N-, P-, M-, G-, L-генах вируса с размером 9989 п.н., с последующей детекцией ампликонов методом горизонтального электрофореза. По итогам анализа оценивали наличие или отсутствие продуктов полимеразной цепной реакции в виде светящихся полос в потоке ультрафиолетового света при длине волны 312 нм. На основании полученных треков ампликонов делали заключение о целостности участков генома вируса бешенства и, как следствие, о полноте инактивации антигена. Для проведения указанной процедуры требуется около 5 ч.

Для амплификации большеразмерного участка генома вируса бешенства впервые была разработана система оригинальных праймеров, дизайн которых представлен в таблице 1 и на рисунке 1.

Для анализа применяли следующие олигонуклеотиды:

1) N-F (для участка высококонсервативного гена N вируса бешенства, кодирующего нуклеопротеин);

2) L9989-R (для участка L-гена вируса бешенства, несущего информацию о РНК-зависимой ДНК-полимеразе). Указанная система праймеров позволяла амплифицировать ПЦР-продукты вируса бешенства с размером 9989 п.н., соответственно.

Предложены критерии интерпретации данных реакции амплификации при

avvb_2021_02.indd 29 26.06.2021 20:37:01

Таблица 1

Дизайн олигонуклеотидных праймеров для реакции амплификации при использовании способа контроля полноты инактивации антигена вируса бешенства

№ п/п	Наименование праймера	Локализация праймера в геноме	Первичная структура олигонуклеотидного праймера (5’-3’)	Размер участка генома, п.н.
1	N-F	ген N	CGCACGCTTAACAACCAGAT	9989
2	L9989-R	ген L	ATTCTCTGGAGACGCCGTGA	

контроле полноты инактивации антигена вируса бешенства в сырье для вакцин. Важным условием качественно проведенных исследований являются результаты испытания контрольных образцов. Если $ПКО_{выд-е\ РНК}$, $ПКО_{ПЦР}$, $ВКО_{выд-е\ РНК}$, $ВКО_{ПЦР}$ после всех стадий исследования в горизонтальном электрофорезе дают положительный результат (наличие ампликонов), а ОКО, $ОИКО_{выд-е\ РНК}$, $ОИКО_{ПЦР}$ – отрицательный результат (отсутствие ампликонов), то в таком случае стадии выделения РНК, обратной транскрипции и реакции амплификации проведены верно, и можно учитывать результаты исследуемых проб. Если в треке исследуемой пробы обнаружены светящиеся продукты ПЦР, то анализируемый участок нуклеиновой кислоты вируса бешенства не поврежден, следовательно, данный образец считается неинактивированным или неполностью инактивированным (рисунок 2, позиция 1). Если во всех треках свечение ампликона отсутствует, то данный участок генома вируса бешенства поврежден, тем самым, репликация вируса бешенства невозможна и он считается авирулентным (рисунок 2, позиция 2). Иными словами, на основании отсутствия ПЦР-продуктов исследуемой пробы по сравнению с положительными контролями позволяет сделать заключение о разрушении нуклеиновой кислоты вируса бешенства в инактивированных суспензиях и, как следствие, об отсутствии вирулентного вируса. В том случае, если обнаружены несоответствия в результатах анализа контролей, требуется повторно провести исследование.

На следующем этапе анализа проводили исследование процесса инактивации вируса бешенства в течение 24 ч β-пропиолактоном с помощью разработанного способа в сравнении с традиционным методом РИФ в монослойной клеточной линии ВНК-21. Суспензию вируса бешенства штамма ВНИИЗЖ с титром инфекционной активности 7,25 lg $ККИД_{50}/см^3$, по данным титрования в перевиваемой монослойной клеточной линии ВНК-21, сразу после репродукции в суспензионной культуре клеток ВНК-21 разделили на 3 емкости и подвергали процессу инактивации с применением БПЛ:

1 флакон – концентрация БПЛ 0,025 %, температура инактивации плюс 36–37 ºС, экспозиция – 4 ч;

2 флакон – концентрация БПЛ 0,050 %, температура инактивации плюс 36–37 ºС, экспозиция – 4 ч;

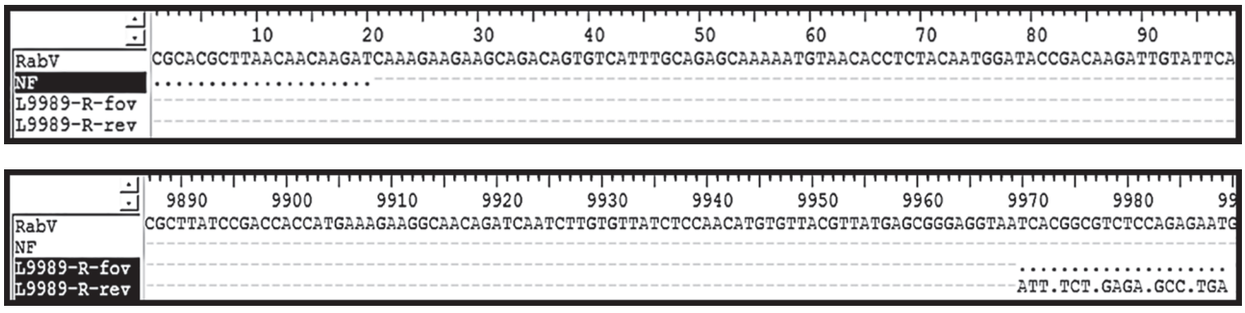

Рис. 1. Дизайн праймеров для амплификации большеразмерного фрагмента кДНК вируса бешенства (RabV – участок генома вируса бешенства штамма ВНИИЗЖ, fov – прямой праймер, rev – обратный праймер, темной полосой выделен интересующий праймер)

avvb_2021_02.indd 30 26.06.2021 20:37:01

3 флакон – концентрация БПЛ 0,050 %, температура инактивации плюс 36–37 ºС, экспозиция – 0,5 ч, далее температура – плюс 4 ºС, экспозиция – 23,5 ч.

Водородный показатель вирусной суспензии поддерживали в диапазоне 7,2–7,6. Суспензии подвергали тщательному перемешиванию в течение 3–5 минут через каждый час. Параллельно исследовали вирус бешенства штамма ВНИИЗЖ, не подвергнутый инактивации, экспозиция которого проводилась при той же температуре и в тот же период времени (контроль инактивации).

Для определения времени полной инактивации после добавления химического агента через 2 ч в стерильных условиях производили отбор проб из всех флаконов. Исследование проводили в трех повторностях. Полученные образцы проверяли на наличие инфекционной активности вируса бешенства в РИФ, а также разработанным способом контроля полноты инактивации антигена вируса бешенства с помощью ОТ-ПЦР. По результатам электрофореза контролей в ОТ-ПЦР, все стадии реакции проведены правильно, и можно учитывать полученные данные исследуемых суспензий вируса бешенства, подвергнутых

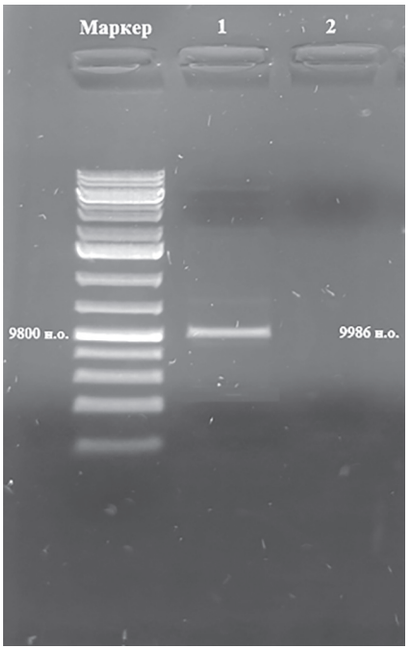

Рис. 2. Электрофореграмма по результатам контроля полноты инактивации антигена вируса бешенства в сырье для вакцин (позиция 1 – проба не инактивирована, позиция 2 – проба инактивирована)

влиянию β-пропиолактона. Результаты анализа в РИФ и ОТ-ПЦР отражены в таблице 2.

Из данных, представленных в таблице 2, видно, что контроль инактивации (вирус бешенства, не подвергнутый инактивации,

Таблица 2

Исследование остаточной инфекционности вируса бешенства штамма ВНИИЗЖ в суспензии после воздействия β-пропиолактоном в разных концентрациях при температуре 36–37 °С (n=3)

Условия инактивации			Результаты определения полноты инактивации вируса бешенства штамма ВНИИЗЖ													
			ОТ-ПЦР							РИФ						
концентрация БПЛ, %	температура, °С	экспозиция, ч	2 ч	4 ч	8 ч	12 ч	16 ч	20 ч	24 ч	2 ч	4 ч	8 ч	12 ч	16 ч	20 ч	24 ч
0,025	36-37	4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,050	36-37	4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,050	36-37	0,5	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
	4-5	23,5														
0,000 (контроль инактивации)	36-37	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,000 (контроль инактивации)	36-37	0,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4-5	23,5														

Примечание: контроль инактивации – вирус бешенства, экспозиция которого проходила при той же температуре и времени, но без химического агента; ОТ-ПЦР: «+» – нуклеиновая кислота вируса бешенства не разрушена, «-» – нуклеиновая кислота вируса бешенства разрушена; РИФ: «+» – наличие специфического свечения иммунных комплексов, «-» – отсутствие специфического свечения иммунных комплексов.

avvb_2021_02.indd 31 26.06.2021 20:37:01

экспозиция при температуре 36–37 °С через 4 ч, а также при экспозиции в течение 0,5 ч при температуре 36–37 °С и 23,5 ч при температуре 4 °С через 24 ч) сохранял вирусную нуклеиновую кислоту без повреждений при детекции в электрофорезе. При этом полная инактивация вируса бешенства штамма ВНИИЗЖ β-пропиолактоном с концентрацией 0,025 % при температуре 36–37 ºС достигалась через 4 ч, с концентрацией 0,050 % при температуре 36–37 ºС – через 4 ч, с концентрацией 0,050 % при температуре 36–37 ºС в течение 2 ч и при температуре 4 ºС в течение 23,5 ч – через 20 ч.

В инактивированных суспензиях вируса бешенства штамма ВНИИЗЖ полностью отсутствовали продукты ПЦР нужного размера, что свидетельствовало о прохождении полной инактивации вируса. Полученные результаты были подтверждены в РИФ. Таким образом, определение полноты инактивации вирусного сырья после воздействия БПЛ с помощью ОТ-ПЦР не уступает по своей эффективности традиционному методу и позволяет значительно сократить время проведения анализа.

На следующем этапе работы исследовали процесс инактивации вируса бешенства штамма ВНИИЗЖ в течение 24 ч 1,2-аминоэтилэтиленимином с помощью разработанного способа в сравнении с традиционным методом РИФ в культуре клеток ВНК-21. Для работы использовали ту же суспензию вируса, что и для опыта с БПЛ. Суспензию вируса сразу после его культивирования подвергали процессу инактивации с применением АЭЭИ (pH 8,2–8,6) с концентрацией 0,025 % при температуре 36–37 ºС в течение 24 ч. Водородный показатель вирусной суспензии поддерживали в диапазоне 7,2–7,6. Суспензию подвергали тщательному перемешиванию в течение 3–5 минут через каждый час. Параллельно исследовали вирус бешенства штамма ВНИИЗЖ, не подвергнутый инактивации, экспозиция которого проводилась при той же температуре и в тот период времени. Исследование проводили в 5 повторностях.

Для определения времени полной инактивации после добавления химического агента через 2, 4, 7, 8, 12, 20 и 24 ч в стерильных условиях производили отбор проб. Полученные образцы исследовали на наличие инфекционной активности вируса бешенства в РИФ, а также с помощью разработанного способа. Результаты исследования в РИФ

Таблица 3

Исследование остаточной инфекционности суспензий вируса бешенства штамма ВНИИЗЖ после воздействия 0,025 % 1,2-аминоэтилэтиленимина при температуре 36–37 °С

Наименование пробы	№ повторности	Результаты определения полноты инактивации вируса бешенства штамма ВНИИЗЖ													
		ОТ-ПЦР							РИФ						
		2 ч	4 ч	7 ч	8 ч	12 ч	20 ч	24 ч	2 ч	4 ч	7 ч	8 ч	12 ч	20 ч	24 ч
инактивированная проба	1	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
	3	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
	4	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
	5	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
контроль инактивации	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание: контроль инактивации – вирус бешенства, экспозиция которого проходила при той же температуре и времени, но без химического агента; ОТ-ПЦР: «+» – нуклеиновая кислота вируса бешенства не разрушена, «-» – нуклеиновая кислота вируса бешенства разрушена; РИФ: «+» – наличие специфического свечения иммунных комплексов, «-» – отсутствие специфического свечения иммунных комплексов.

avvb_2021_02.indd 32 26.06.2021 20:37:01

Таблица 4

Пределы диагностических возможностей теста опосредованного определения полноты инактивации антигена вируса бешенства в сырье для вакцины с применением ОТ-ПЦР при амплификации большеразмерного фрагмента

Показатели	Результаты анализа	
	РИФ	ОТ-ПЦР
ДП	314	312
ДО	314	314
ЛП	0	0
ЛО	0	0
Всего:	628	628
Чувствительность, %	100,00	99,36
Специфичность, %	100,00	100,00
Общая точность, %	100,00	99,68

Примечание: ДП – достовернположительный результат, ДО – достовернотрицательный результат, ЛП – ложноположительный результат, ЛО – ложнотрицательный результат.

и ОТ-ПЦР отобранных суспензий вируса бешенства после экспозиции с АЭЭИ и без него отражены в таблице 3.

Из данных, представленных в таблице 3, видно, что по данным ОТ-ПЦР контроль инактивации (вирус бешенства, не подвергнутый инактивации, экспозиция при температуре 36–37 °С в течение 24 ч) сохранил вирусную кДНК без повреждений в участке длиной 9986 п.н. Полная инактивация вируса бешенства штамма ВНИИЗЖ 1,2-аминоэтилэтиленимином с концентрацией 0,025% при температуре плюс 36–37 ºС достигается через 8 ч. Спустя этот период времени продукты ПЦР в указанной тест-системе полностью отсутствовали, что свидетельствовало о прохождении полной инактивации вируса. Полученные результаты были подтверждены в РИФ. Таким образом, опосредованное определение полноты инактивации вируса бешенства штамма ВНИИЗЖ после воздействия АЭЭИ с помощью ОТ-ПЦР не уступает по своей эффективности традиционному методу и позволяет сократить время проведения исследования до 5 ч.

На заключительном этапе исследования проводили тестирование разработанного способа контроля полноты инактивации антигена вируса бешенства при производстве антирабических вакцин для ветеринарии с применением метода ОТ-ПЦР. Для определения чувствительности разработанного теста опосредованного определения полноты инактивации антигена вируса ящура исследовали 314 образцов суспензий, которые являлись истинно инактивированными по данным исследования в РИФ. Постановку теста проводили, как отражено выше. В результате анализа в ОТ-ПЦР при амплификации большеразмерного фрагмента генома вируса бешенства определили, что из 314 истинно инактивированных образцов суспензий 312 определены в качестве инактивированных, а 2 – в качестве неинактивированных, т.е. количество ДП составило 312, а ЛО – 2 (таблица 4). Таким образом, чувствительность теста составила 99,36 %.

Для исследования специфичности метода тестировали 314 образцов суспензий, которые являлись истинно неинактивированными по данным исследования в РИФ. В результате исследования в ОТ-ПЦР определили, что из 314 истинно неинактивированных суспензий 314 определены в качестве неинактивированных, статус инактивированных суспензий присвоен не был, т. е. количество ДО составило 360 (таблица 4). Таким образом, специфичность разработанного теста составила 100,00 %. Учитывая полученные данные рассчитали общую точность метода, которая соответствовала 99,68 %. Следует также отметить, что с помощью разработан-

avvb_2021_02.indd 33 26.06.2021 20:37:01

ного способа одновременно проверяли до 96 образцов (7 контролей и 89 исследуемых образцов), учитывая возможности амплификатора.

Заключение

Разработан способ опосредованного контроля полноты инактивации антигена вируса бешенства с применением обратно-транскриптазной полимеразной цепной реакции с последующим электрофорезом ампликонов в агарозном геле.

Предлагается применение оптимизированной ОТ-ПЦР с использованием системы оригинальных олигонуклеотидных праймеров N-F и L9989-R, детектирующих протяженный участок в N-, P-, M-, G-, L-генах вируса бешенства размером 9986 п.н., с последующим электрофорезом ампликонов в агарозном геле. С помощью данного метода возможно выявлять неповрежденную нуклеиновую кислоту вируса бешенства до процесса инактивации и ее отсутствие после воздействия инактивантами. Наличие продуктов ПЦР опосредованно свидетельствует о сохранении нуклеиновой кислоты вируса без повреждения и, как следствие, о наличии вирулентности, а отсутствие ампликонов указанного размера – о повреждении РНК и потери вирулентных свойств вирусной частицы.

Определена возможность одновременного исследования большого количества проб (до 89) для определения полноты инактивации антигена вируса бешенства в сырье для антирабической инактивированой вакцины в течение 5 ч.

Доказано, что разработанный способ позволяет с высокой степенью достоверности определять полноту инактивации антигена вируса бешенства. Выявлено, что чувствительность способа составила 99,36 %, специфичность – 100,00 %, общая точность – 99,68 %.

Исследование выполнено в рамках научного направления ФГБУ «ВНИИЗЖ» «Ветеринарное благополучие». Исследование выполнено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Груздев К. Н. Бешенство животных. / К. Н. Груздев, А. Е. Метлин. Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2019. 394 с.

2. Курашова С. С. Сравнительная характеристика инактивирующих агентов для создания вакцин против геморрагической лихорадки с почечным синдромом / С. С. Курашова, А. А. Ишмухаметов, М. С. Егорова [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2018. № 17(4). С. 26–29.

3. Метлин А. Е. Современные аспекты классификации лиссавирусов / А. Е. Метлин // Ветеринария сегодня. 2017. № 3 (22). С. 52–57.

4. Метлин А. Е. Комплекс средств и методов диагностики и борьбы с бешенством: автореферат … д. вет. н. / А. Е. Метлин. Казань, 2018. 48 с.

5. Федоров Д. Г. Усовершенствование технологии изготовления и контроля инактивированной вакцины против классической чумы свиней: Автореферат. … к. вет. н. / Д. Г. Федоров. Покров, 1999. 24 с.

6. Barrat, J. Rabies diagnosis / J. Barrat, E. Picard-Meyer, F. Cliquet // Developments in Biologicals. 2006. Vol. 125. P. 71–77.

7. Chomczynski P. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. / P. Chomczynski, N. Sacchi // Nat Protoc. 1 (2). 2006. P. 581–585.

8. GenBank. [Электронный ресурс] / URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov. (Дата обращения: 22.01.2021).

9. Ito M. Detection of rabies virus RNA isolated from several species of animals in Brazil by RT-PCR / M. Ito, T. Itou, T. Sakai, M. F. Santos, Y. T. Arai, T. Takasaki, I. Kurane, F. H. Ito // J. Vet. Med. Sci. 2001 Dec;63(12):1309-13. doi: 10.1292/jvms.63.1309.

10. Khazaie Y. Poly[N-(2-aminoethyl)ethyleneimine] as a new non-viral gene delivery carrier: the effect of two protonatable nitrogens in the monomer unit on gene delivery efficiency / Y. Khazaie, F. A. Dorkoosh, L. Novo, E. Van Gaal, A. Fassihi, S. Z. Mirahmadi-Zareh, M. H. N. Esfahani, C. F. Van Nostrum, W. E. Hennink // J. Pharm. Pharm. Sci. 2014. N. 17(4). P. 461–474. doi: 10.18433/j3r015.

11. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019 (OIE). Rabies. 2019. Ch. 3.1.17. P. 578 –612.

12. The Analysis of DNA or RNA using Its Wavelengths: 230 nm, 260 nm, 280 nm. Bioteachnology.com [Электронный ресурс] / URL: http://bioteachnology.com/dna/analysis-dna-rna-wavelengths-230-260-280-nm. (Дата обращения 13.01.2021).

13. WHO Rabies vaccines: WHO position paper-recommendations. Vaccine. 2010. Vol. 28. P. 7140–7142.

14. β-Propiolactone. National Toxicology Program Rep Carcinog. 2011. N. 12. P. 366–367.

avvb_2021_02.indd 34 26.06.2021 20:37:01

DOI: 10.24412/2074-5036-2021-2-35-39
УДК 619.636.03.033:615
Ключевые слова: телята, молодняк крупного рогатого скота, бронхопневмония, аутогемотерапия, незаразная патология
Key words: calves, young cattle, bronchopneumonia, autohemotherapy, non-infectious pathology.

Ситчихина А. В.

ПРИМЕНЕНИЕ АУТОГЕМОТЕРАПИИ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ НЕЗАРАЗНОЙ ПАТОЛОГИИ МОЛОДНЯКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

APPLICATION OF AUTOHEMOTHERAPY IN COMPLEX TREATMENT NON-INFECTIOUS PATHOLOGY OF YOUNG CATTLE

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный агротехнологический университет имени П. А. Костычева»
Адрес: 390044, Россия, Рязань, ул. Костычева, д. 1
Ryazan state agrotechnological University named after P. A. Kostychev
Adress: 390044, Russia, Ryazan, Kostychev st., 1

Ситчихина Алена Владимировна, ассистент кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы, хирургии, акушерства и внутренних болезней животных. E-mail: sit4ihina@yandex.ru
Sitchikhina Alena Vladimirovna, Assistant of the Department of Veterinary and Sanitary Expertise, Surgery, Obstetrics and Internal Diseases of Animals. E-mail: sit4ihina@yandex.ru

Аннотация. В статье представлена оценка терапевтической и экономической эффективности применения аутогемотерапии в комплексном лечении хронической бронхопневмонии молодняка крупного рогатого скота. Лечебный эффект аутогемотерапии основан на стимулировании неспецифического иммунного ответа организма животного. Данный метод дает высокие терапевтический и экономический эффекты, что позволяет его широко внедрять в ветеринарную практику.

Summary. *The article presents an assessment of the therapeutic and economic effectiveness of autohemotherapy in the complex treatment of chronic bronchopneumonia in young cattle. The therapeutic effect of autohemotherapy is based on stimulating the non-specific immune response of the animal's body. This method provides high therapeutic and economic effects, which allows it to be widely implemented in veterinary practice.*

Введение

Увеличение поголовья скота и повышение продуктивности сельскохозяйственных животных зависят от его сохранения и правильного выращивания [1, 8]. Однако, широкое распространение респираторных патологий молодняка тормозит развитие животноводства [5]. Заболевания, поражающие органы дыхания, составляют 20–30 % от общего количества незаразных болезней в хозяйстве и занимают второе место, уступая желудочно-кишечным заболеваниям. Одной из самых распространенных респираторных болезней молодняка крупного рогатого скота является бронхопневмония [2, 7]. В лечении больных животных наибольшее значение играют антибиотики, но лечебный эффект от их применения достигается в начальную стадию заболевания, когда они могут проникать через гистогематический барьер. При затяжном течении болезни, по мере нарастания отека, клеточной инфильтрации и склероза вокруг воспалительного очага, в легких происходит сдавливание и запустение капилляров, вследствие чего затрудняется проникновение в очаг воспаления лекарственных средств [3, 6].

Поиск новых, более эффективных, безвредных, экономически выгодных, а также доступных лекарственных средств является первостепенной задачей.

Целью настоящего исследования было изучение эффективности применения аутогемотерапии в комплексном лечении бронхопневмонии телят.

Материалы и методы

Исследование было выполнено на кафедре ветеринарно-санитарной экспертизы, хирургии, акушерства и внутренних болезней животных ФГБОУ ВО Рязанского ГАТУ, в научном центре лабораторных исследований ФГБОУ ВО РГАТУ, в ГБУ РО «Рязанская

avvb_2021_02.indd 35 26.06.2021 20:37:01

Таблица 1

Схема лечения хронической бронхопневмонии телят

№	Виды терапии	Способ применения и дозы	
		опытная группа	контрольная группа
1	Диетотерапия	Исключение из рациона раздражающих кормов и холодного водопоя.	
2	Антибиотикотерапия	Зитрекс (азитромицин): внутримышечно, по 2 мл на голову двукратно, в 1-ый и 3-ий дни лечения.	
3	Симптоматическая терапия	Инфларет (мелоксикам): внутримышечно, однократно. 2,5 мл/100 кг	
4	Заместительная терапия	Витам: внутримышечно по 5 мл/10 кг в сутки, 1 раз в день, 7 дней подряд	
5	Неспецифическая стимулирующая терапия	Аутогемотерапия	-

облветлаборатория». Экспериментальная часть работы была выполнена на базе животноводческого комплекса ООО «Малинищи» Пронского района Рязанской области. С целью изучения распространения бронхопневмонии на предприятии нами были изучены журналы учета больных животных, а также проведен анализ рациона животных и условий их содержания.

Объектом исследования являлись телята с диагнозом «хроническая бронхопневмония». Диагноз ставился на основании данных анамнеза, клинической картины, лабораторных исследований (общий анализ крови, исследования носовых истечений).

Для проведения опыта были сформированы 2 группы по принципу аналогов (2-месячные телята весом 65–70 кг, черно-пестрой голштинизированной породы): контрольная и опытная (n=12). В обоих группах в схему лечения хронической бронхопневмонии входили следующие мероприятия: создание комфортных условий содержания, диетотерапия, антибиотикотерапия, симптоматическая терапия, витаминотерапия. В опытной группе дополнительно была назначена в качестве неспецифической стимулирующей терапии аутогемотерапия (таблица 1).

На протяжении всего опыта в течение 7 дней, у телят контрольной и опытной групп проводили клинический осмотр и лабораторные исследования крови до и после опыта. Предварительно были сделаны смывы из носовой полости стерильным тампфером для определения микрофлоры и ее антибиотикочувствительности (таблица 2). Забор крови у животных производили из яремной вены на 1-ый и 7-ой дни лечения с соблюдением всех правил асептики и антисептики. Исследования цельной крови проводили на гематологическом анализаторе “Abacus junior vet 1.22” (DIATRON). Лейкограмму исследовали путем подсчета 200 лейкоцитов разных видов, окрашенных по Романовскому-Гимзе с вычислением процентного соотношения каждого вида [4].

Согласно данным таблицы 2, наибольшая чувствительность высеянной микрофлоры была к следующим антибиотикам: ципрофлоксацин, канамицин, гентамицин, амикацин и фосфомицин, азитромицин. Для лечения животных нами был применен антибиотик азитромицин группы макролидов.

Аутогемотерапию проводили в опытной группе животных по следующей схеме: в 1-ый день лечения 5 мл крови брали из яремной вены и сразу же вводили внутримышечно в область шеи, далее повтор через каждые 48 часов с увеличением дозы на 1 мл. Всего за время опыта было сделано три инъекции аутогемотерапии. Внутримышечные инъекции всех препаратов делали в среднюю треть шеи, согласно общепринятой методике. Животных считали клинически здоровыми при отсутствии клинических признаков бронхопневмонии. Статистическая обработка проводилась с использованием критерия Стьюдента.

avvb_2021_02.indd 36 26.06.2021 20:37:01

Таблица 2

Результаты лабораторных данных

Антибиотик, группа	Действующее вещество	Чувствительность
Эритромицин (группа макролидов)	эритромицин	отсутствует
Ципрофлоксацин (группа фторхинолонов 2-го поколения)	ципрофлоксацин	сильная
Ампициллин (группа пенициллинов)	ампициллин	отсутствует
Канамицин (группа аминогликозидов)	канамицин	сильная
Цефтриаксон (группа цефалоспоринов 3-го поколения)	цефтриаксон	отсутствует
Гентамицин (группа аминогликозидов)	гентамицин	сильная
Доксициклин (группа тетрациклинов)	доксициклина гиклат	отсутствует
Амикацин (группа аминогликозидов 3-го поколения)	азитромицин	сильная
Фосфомицин	фосфоновая кислота	сильная
Азитромицин (группа макролидов)	энрофлоксацин	сильная
Тетрациклин (группа тетрациклинов)	тетрациклин	отсутствует
Левомицетин (группа хлорамфениколов)	левомицетин	отсутствует

Результаты и обсуждение

В процессе исследования было установлено, что хроническая бронхопневмония является часто встречаемым заболеванием на комплексе и поражает примерно 8,4 % поголовья молодняка крупного рогатого скота. Мы связываем такую высокую встречаемость болезни из-за не соблюдений ветеринарно-санитарных условий содержания, несбалансированного рациона, сквозняков, нарушений технологии выпойки молозива в первые часы после отела, технологических стресс-факторов. В состав рациона телят входили: молоко цельное (2 л), комбикорм КК-1 (1,8 кг), сено клеверо-тимофеечное (0,6 кг). Установлено, что у всех телят на момент проведения опыта отмечались признаки хронической бронхопневмонии: угнетение, снижение привесов, субфебрильная лихорадка, снижение аппетита, скудные носовые катарально-гнойные истечения, отсутствие аппетита, смешанная одышка, сухой кашель, жесткое везикулярное дыхание, очаги притупления в области передних и средних долей легких.

В сравнительном аспекте опытной и контрольной групп была установлена терапевтическая эффективность предложенной схемы лечения хронической бронхопневмонии. Бактериологическим методом исследования из проб выделена культура – *Str. Faecalis*.

Так же во время проведения опыта нами была изучена терапевтическая эффективность аутогемотерапии (таблица 3).

Таблица 3

Терапевтическая эффективность аутогемотерапии

Показатель	Группа (n=12)	
	опыт	контроль
Полное клиническое выздоровление, гол	11 (91,6 %)	8 (66,7 %)
Неполное клиническое выздоровление, гол	1 (8,3 %)	2 (16,6 %)
Рецидив, гол	1 (8,3 %)	3 (25 %)
Пало (гол)	-	-
Время выздоровления (гол)	5,2±0,15	6,4±0,12
Привесы (гр)	380,5±12,5*	342,1±10,5

Примечание: * – $p<0,05$ – разница достоверна по сравнению с контролем.

avvb_2021_02.indd 37 26.06.2021 20:37:01

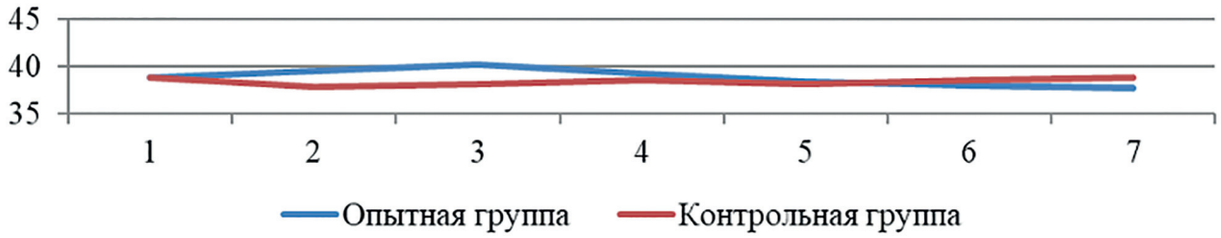

Рис. 1. Динамика температуры тела в процессе лечения, °С.

Согласно данным таблицы 3, в опытной группе количество полностью выздоровевших животных составило 91,6 %, в то время как в контрольной группе – 66,7 % . Количество животных с неполным выздоровлением в опытной группе: 1 голова, в контроле: 2 головы. Рецидивы наблюдали у одного животного из опытной группы и трех коров из контрольной. Сроки выздоровления в опытной группе были на 1,2 суток меньше, чем в контрольной группе, мы связываем это с тем, что во время применения аутогемотерапии происходит стимуляция иммунной системы. Изучая динамику привесов телят, получивших лечение аутогемотерапией, отмечено, что в опытной группе они были на 10,1 % выше, чем в контроле.

Анализируя динамику клинических показателей (рисунок 1) выявлено, что в опытной группе на 3-и сутки лечения произошло повышение температуры тела, а затем ее снижение. В контрольной группе, напротив, на 2 сутки лечения температура снизилась, а затем на 6–7 сутки поднялась на верхние пределы референсных значений.

При исследовании морфологического состава клеток крови отмечено, что в начале заболевания, как в опытной, так и в контрольной группе наблюдался нейтрофильный лейкоцитоз с регенеративным сдвигом ядра влево, моноцитоз, что указывало на наличие воспалительного процесса в организме, а также повышение гематокрита, что связано со вторичным обезвоживанием при хронической бронхопневмонии. Количество эритроцитов изначально было повышенным на 71,2 %, что возможно являлось приспособительной реакцией организма при развившейся гипоксии (таблица 4).

Установлено, что на 7 день наблюдения, аутогемотерапия способствовала усилению как гемопоэза, так и лейкопоэза в опытной группе. Так, количество эритроцитов и лейкоцитов достоверно повысилось на 13,8 %

Таблица 4

Гематологические показатели телят

Показатели	Референсные значения	Группа (n=12)			
		опыт		контроль	
		до опыта	после опыта	до опыта	после опыта
Гематокрит, %	36-37	40,15±0,62	37,44±0,71	39,74±0,95	32,44±0,84
Гемоглобин, г/л	90-126	110,2±2,9	125,4±2,5**	109,2±1,92	103,8±2,05
Эритроциты, $\times 10^{12}$/л	6,4-6,8	7,2±0,24	8,3±0,26*	8,9±0,25	7,6±0,28*
Лейкоциты, $\times 10^{9}$ /л	9,3-12,5	11,9±0,20	12,8±0,18*	12,45±0,46	9,43±0,53**
Юные, %	1-4	0,8±0,04	0,9±0,08	1,2±0,06	0,6±0,08
Палочкоядерные нейтрофилы, %	1-6	8,4±0,56	12,1±0,84*	9,6±0,35	5,6±0,72*
Сегментоядерные нейтрофилы, %	24-62	25,6±1,17	28,3±1,25	23,5±1,18	30,3±1,26
Эозинофилы, %	0,5-6	4,8±0,24	7,6±0,32	7,4±0,42	7,2±0,36
Моноциты, %	1-5	5,2±0,30	6,4±0,22	6,5±0,28	3,2±0,24
Лимфоциты, %	20-64	55,18±1,64	46,2±1,58**	51,8±0,56	55,1±0,68

Примечание: * – $p<0,01$; ** – $p<0,001$ – разница достоверна по сравнению с показателями до лечения.

avvb_2021_02.indd 38 26.06.2021 20:37:01

и 7,0 % соответственно по сравнении с показателями до лечения. При этом показатели лейкоцитов остались в пределах физиологических норм. Напротив, в контрольной группе количество эритроцитов и лейкоцитов снизилось на 14,6 % и 22,5 % соответственно по сравнению с показателями до лечения. Также отмечено достоверное снижение количества лимфоцитов в опытной группе на 16,2 %. Все эти факты подтверждают повышение реактивности организма животного при применении аутогемотерапии. За время проведения опыта не было зафиксировано случаев побочных явлений у телят при применении неспецифической стимулирующей терапии.

Экономическая эффективность данной схемы лечения составила 1,2 руб. на руб. затрат, так как аутогемотерапия не требует дополнительных расходов.

Заключение

Установлено, что терапевтическая эффективность схемы лечения хронической бронхопневмонии с применением аутогемотерапии у телят составила 92 %, рецидивность болезни составила 8,3% , срок выздоровления составил 5,2 суток. Применяемая схема лечения способствовала повышению реактивности организма, за счет усиления эритропоэза и лейкопоэза. Экономическая эффективность лечения в опыте составила 1,52 руб. на руб. затрат, по сравнению с контролем 1,18 руб.

Список литературы

1. Вотинцева А. П. Динамика показателей крови при профилактике бронхопневмонии телят [Текст] / А. П. Вотинцева, С. П. Ковалев. // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2019. № 1. С. 4.

2. Герцева К. А. Оценка терапевтической и экономической эффективности различных схем лечения бронхопневмонии у телят [Текст] / К. А. Герцева, А. В. Ситчихина // Научно-практические достижения молодых ученых как основа развития АПК: Материалы Всероссийской студенческой научно-практической конференции. 2019. С. 272–276.

3. Герцева К. А. Применение лоперамида в терапии неинфекционной алиментарной диареи у телят [Текст] / К. А. Герцева, А. В. Ситчихина // Вестник Рязанского ГАТУ. № 1 (41). 2019. С. 12–18.

4. Герцева К. А. Сравнительная эффективность лечебных мероприятий при алиментарной диспепсии у телят [Текст] / К. А. Герцева, В. В. Сазонова // Инновационные подходы к развитию агропромышленного комплекса региона: Материалы 67-ой Международной научно-практической конференции. 2016. С. 160–163.

5. Кондрахин И. П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики – справочник [Текст] / И. П. Кондрахин, А. В. Архипов, В. И. Левченко, Г. А. Таланов, Л. А. Фролова, В. Э. Новиков. Москва: издательство Колос, 2004. С. 520.

6. Мельник В. В. Комплексное лечение бронхопневмонии телят с применением спелимикса [Текст] / В. В. Мельник, В. В. Бражник. // Известия сельскохозяйственной науки Тавриды. 2013. № 155. С. 5.

7. Мельникова Н. В. Сравнительная эффективность гентамицина и энроксила при бронхопневмонии телят [Текст] / Н. В. Мельникова, Л. В. Ческидова, О. В. Кутняхова. // Вестник Воронежского государственного аграрного университета. 2018. № 1. С. 6.

8. Ситчихина А. В. Изучение схемы эффективности схемы профилактики бронхопневмонии телят с применением драксина и гемобаланса [Текст] / А. В. Ситчихина, К. А. Герцева // Молодые исследователи агропромышленного и лесного комплексов – регионам : Сборник научных трудов по результатам работы IV международной молодежной научно-практической конференции. 2019. С. 106–110.

9. Британ М. Н. Имммунологический статус коров при лечении субклинического мастита альвеосолом [Текст] / М. Н. Британ, К. А. Герцева, Е. В. Киселева, В. В. Кулаков, Э. О. Сайтханов // Молочно-хозяйственный вестник. 2019. № 4 (36). С. 21–30.

10. Сайтханов Э. О. Болезни копытец крупного рогатого скота в современных животноводческих комплексах [Текс] / Э. О. Сайтханов, В. В. Кулаков, Д. А. Кузнецов // Научное сопровождение инновационного развития агропромышленного комплекса: теория, практика, перспективы. Материалы 65-й Международной научно-практической конференции. Министерство сельского хозяйства Российской Федерации, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Рязанский государственный агротехнологический университет имени П.А. Костычева». 2014. С. 45–49.

Подписной индекс журнала
«Актуальные вопросы ветеринарной биологии»:
Агентство «Роспечать» – **33184**

DOI: 10.24412/2074-5036-2021-2-40-43
УДК 612.2 : 617 – 089.5.– 031.81 : 636.1
Ключевые слова: газообмен, лошадь, общая анестезия, галогенсодержащие анестетики
Key words: gas exchange, horse, general anesthesia, halogen-containing anesthetics

Сорока В.А., Нечаев А.Ю.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ ГАЗООБМЕНА ПРИ ОБЩЕЙ АНЕСТЕЗИИ ЛОШАДЕЙ

PREVENTION AND CORRECTION OF GAS EXCHANGE VIOLATIONS IN GENERAL ANESTHESIA OF HORSES

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»
Адрес: 196084, Россия, Санкт-Петербург, Черниговская ул., д. 5
Saint-Petersburg State University of Veterinary Medicine
Adress: 196084, Russia, Saint-Petersburg, 5 Chernigovskaya

Сорока Виталий Александрович, аспирант кафедры акушерства и оперативной хирургии.
E-mail: aspirantsva@gmail.com
Soroka Vitalij Aleksandrovich, postgraduate student of the Dept. of Obstetrics and Operative Surgery.
E-mail: aspirantsva@gmail.com
Нечаев Андрей Юрьевич, доктор вет. наук, доцент кафедры акушерства и оперативной хирургии.
E-mail: netschajew@yandex.ru
Nechaev Andrei Yurjevich, Doctor of Veterinary Science, Associate Professor of the Dept. of Obstetrics and Operative Surgery E-mail: netschajew@yandex.ru

Аннотация. Целью работы было проведение оценки состояния респираторной системы лошадей, которым выполнялись хирургические манипуляции под общей анестезией продолжительностью до 1 часа в ветеринарных клиниках Москвы и Санкт-Петербурга в период с 2018 по 2020 годы. Объектом исследования были 18 лошадей (9 жеребцов, 3 мерина, 6 кобыл) в возрасте от двух до двенадцати лет. Работа посвящена изучению динамики количественных и качественных показателей эффективности внешнего дыхания на различных этапах ингаляционного наркоза с применением галогенсодержащих анестетиков: фторотана, изофлурана и севофлурана. Наиболее выраженное снижение уровня альвеолярной вентиляции на 32,2 % по сравнению с исходным уровнем было отмечено в период введения при использовании фторотана. Падение уровня газообмена при анестезии изофлураном и севофлураном было менее выражено и составляло соответственно 13,8 % и 12,4 %.

Summary. *The purpose of the work was to assess the state of the respiratory system of horses that underwent surgical manipulations under general anesthesia for up to 1 hour in veterinary clinics of Moscow and St. Petersburg in the period from 2018 to 2020. The object of the study was 18 horses (9 stallions, 3 geldings, 6 mares) aged from two to twelve years. The work is devoted to the study of quantitative and qualitative indicators of the effectiveness of external respiration at various stages of inhalation anesthesia with the use of halogen-containing anesthetics: halothane, isoflurane and sevoflurane. The most pronounced decrease in the level of alveolar ventilation by 32.2 % compared to the baseline level was observed during the administration period when using halothane. The decrease in the level of gas exchange during anesthesia with isoflurane and sevoflurane was less pronounced and amounted to 13.8 % and 12.4 %, respectively.*

Введение

Предупреждение и борьба с расстройствами функции дыхания во время проведения общей анестезии у лошадей является актуальной проблемой. Многие фармакологические средства, используемые для анестезиологической защиты животных, в зависимости от дозировки, путей и скорости введения, индивидуальной чувствительности, продолжительности и тяжести операции оказывают депрессивное воздействие на дыхание [4, 5, 9]. При использовании как ингаляционных, так и неингаляционных анестетиков страдают преимущественно механизмы, обеспечивающие оксигенацию крови в лёгких и выведение из организма углекислого газа, то есть нарушается легочный газообмен. Предупреждения о возможности таких осложнений содержатся в аннотациях по применению седативных препаратов и средств для общей анестезии. Поэтому их использование в ветеринарной практике требует анестезиологического оснащения и знаний путей коррекции подобных нарушений.

avvb_2021_02.indd 40 26.06.2021 20:37:02

По статистике смертность при проведении общей анестезии у лошадей в 10 раз выше, чем у мелких животных [2, 7, 11]. В связи с этим вопросы выявления и коррекции нарушений газообмена при анестезии лошадей актуальны на сегодняшний день. Решение этих вопросов требует повышенного внимания к организации проведения общей анестезии и контролю состояния функции дыхания во время нее. Углубленное изучение данной проблемы должно способствовать снижению уровня смертности и частоты возникновения осложнений.

Как высокоэффективный и безопасный метод анестезиологической защиты пациента в критических ситуациях признан эндотрахеальный комбинированный наркоз. В последние десятилетия он получил распространение и в ветеринарной практике. Этому способствовало развитие учебных курсов по специальности «Ветеринарная анестезиология» и внедрение в ветеринарию наркозных аппаратов и приборов, позволяющих оказывать анестезиологическое обеспечение и проводить мониторинг жизнеобеспечивающих функций у животных [1, 6].

Важнейшим показателем адекватности выбранного способа анестезии является его влияние на функцию респираторной системы у лошадей. В данной работе проведён анализ динамики количественных и качественных показателей эффективности внешнего дыхания на различных этапах ингаляционного наркоза с применением галогенсодержащих анестетиков: фторотана, изофлурана и севофлурана [8, 10].

Материалы и методы

Объектом исследования были 18 лошадей (9 жеребцов, 3 мерина, 6 кобыл) в возрасте от двух до двенадцати лет. Данные лошади относились к разным породным группам, содержались в разных условиях, большая часть из них несла верховые нагрузки. Большинство лошадей оперировались на базе ветеринарной клиники «Форсайд» (Санкт-Петербург) и «Новый век» (Москва). Исследования функциональной устойчивости респираторной системы лошадей выполнялись при однотипных хирургических лечебных манипуляциях продолжительностью около часа, которые были связаны с ортопедической патологией и сменой гипсовых повязок.

Всем лошадям проводили полный клинический осмотр перед проведением общей анестезии и устанавливали внутривенный катетер в ярёмную вену для введения лекарственных препаратов. Для вводной анестезии и медикаментозного повала лошадей использовали внутривенное введение тиобарбитуратов (тиопентал натрия 4–8 мг/кг внутривенно) после предварительной седации ксилазином или ацепромазином (0,03–0,05 мг/кг внутривенно), а также введение миорелаксантов, таких как гуаифенезин (100 мг/кг внутривенно). С целью расслабления мышц и обезболивания применялась также комбинация ксилазина гидрохлорида в дозе 1,1 мг/кг внутривенно с последующим введением кетамина гидрохлорид в дозе 2,2 мг/кг внутривенно в сочетании с диазепамом в дозе 0,05–0,1 мг/кг внутривенно. Диазепам вводился для обеспечения расслабления мышц и улучшения качества индукции анестезии и восстановления. В качестве основних анестетиков для поддержания общей анестезии использовались фторотан (I группа, n=6), изофлуран (II группа, n=6) и севофлуран (III группа, n=6). Стабильная дозировка и подача перечисленных ингаляционных анестетиков обеспечивалась отечественным портативным наркозным аппаратом Минивап-200/S [1]. На всех этапах общей анестезии (введение, поддержание, пробуждение) регистрировались показатели внешнего дыхания: частота дыхания (f), дыхательный объём (V_T), минутная вентиляция (V_E), эффективность вентиляции – отношение альвеолярной вентиляции к минутной (V_A/V_E) и вентиляционный эквивалент по кислороду (EQO_2). Также проводился постоянный ЭКГ-контроль и оксигемометрия [3].

Результаты и обсуждение

Клинический статус всех исследуемых лошадей характеризовался отсутствием сопутствующей патологии со стороны сердечно-сосудистой и респираторной систем. Исходные показатели внешнего дыхания во

avvb_2021_02.indd 41 26.06.2021 20:37:02

всех исследуемых группах перед проведением анестезии были в пределах нормы. Результаты исследований показателей легочного газообмена, проведённых на 18 лошадях, представлены в таблице 1.

Анализируя данные, приведённые в таблице 1, можно утверждать, что объём вентиляции (V_E) снижался как при ингаляционной анестезии фторотаном так и при применении изофлурана и севофлурана. При использовании фторотана снижение величины V_E регистрировалось на всём протяжении общей анестезии. Наиболее достоверное падение уровня вентиляции по сравнению с исходным значением (26,9±0,1) отмечалось при применении изофлурана на этапе введения в анестезию и составляло 21,1±0,1 (t = 2,8).

Анализ изменений структуры объема минутной вентиляции показал, что такую динамику изменений V_E определяет разнонаправленность исходных величин: на всех этапах ингаляционной анестезии фторотаном отмечалось достоверное увеличение частоты (f) и уменьшение глубины дыхания (V_T), при анестезии изофлураном и севофлураном – урежение частоты и возрастание объема дыхания.

Показатель V_A/V_E, характеризующий уровень альвеолярной вентиляции, то есть той части объема воздуха, которая непосредственно участвует в газообмене, уменьшался как при ингаляционной анестезии фторотаном, так и при применении изофлурана и севофлурана. В первом случае при использовании фторотана снижение объёма воздуха, участвующего в газообмене, было наиболее значительным, особенно в период введения, и составляло 32,2 % по сравнению с исходным уровнем. Снижение уровня альвеолярной вентиляции при анестезии изофлураном и севофлураном было менее выражено и составляло соответственно 13,8 % и 12,4 %, что позволяло избегать осложнений, связанных с угнетением функции дыхания во время проведения общей анестезии.

Падение уровня газообмена в альвеолах отражалось и в увеличении вентиляционного эквивалента (EQO_2) по кислороду. Причем, большее увеличение EQO_2 – в среднем на 9,8 % отмечалось при применении фторотана, в меньшей степени – в среднем на 2,4 % регистрировалось при ингаляционной анестезии изофлура-

Таблица 1

Показатели внешнего дыхания у лошадей на различных этапах общей анестезии с применением галогенсодержащих анестетиков (M±m)

Параметры газообмена	Ингаляционный анестетик	Исходные данные	Этапы общей анестезии			
			Введение	Поддержание		Пробуждение
			5 мин.	15 мин.	30 мин.	45 мин.
V_T, л	Фторотан	2,4 ± 0,2	1,7 ± 0,1*	1,5 ± 0,2	1,6 ± 0,1	1,9 ± 0,2
	Изофлуран	2,3 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,7 ± 0,1	2,7 ± 0,2	2,6 ± 0,1
	Севофлуран	2,3 ± 0,2	2,5 ± 0,2	2,6 ± 0,2	2,5 ± 0,2	2,4 ± 0,3
f, мин$^{-1}$	Фторотан	9,4 ± 0,5	12,5 ±0,6*	14,8 ± 0,4*	13,2± 0,3*	11,6 ±0,5
	Изофлуран	11,7 ± 0,5	8,1 ± 0,4*	7,8 ± 0,5*	9,3 ± 0,6	10,5 ± 0,4
	Севофлуран	10,9 ± 0,4	8,8 ± 0,5	7,6 ± 0,3*	8,9 ± 0,3	10,1 ± 0,4
V_E, л	Фторотан	22,6 ± 0,3	21,2 ± 0,2	22,2 ± 0,3	21,0±0,2	22,0 ± 0,2
	Изофлуран	26,9± 0,1	21,1 ± 0,1*	21,1 ± 0,1*	25,1 ± 0,1	27,3 ± 0,2
	Севофлуран	25,1± 0,2	22,0 ± 0,3	19,8 ± 0,4*	22,3 ± 0,3	24,3 ± 0,1
V_A/V_E, %	Фторотан	66,0 ± 0,6	44,8 ±0,5*	46,2 ± 0,2*	48,2 ± 0,5*	53,0 ± 0,3*
	Изофлуран	66,0 ± 0,3	56,9 ± 0,4*	55,1 ± 0,4*	57,4 ± 0,4*	56,6 ± 0,3*
	Севофлуран	65,9 ± 0,3	57,7 ± 0,3*	58,2 ± 0,3*	61,8 ± 0,6	64,5 ± 0,5
EQO_2, л (на 100мл O_2)	Фторотан	2,5 ± 0,3	2,8 ± 0,2	2,7 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,6 ± 0,4
	Изофлуран	2,4 ± 0,1	2,5 ± 0,3	2,4 ± 0,4	2,5 ± 0,2	2,4 ± 0,4
	Севофлуран	2,6 ± 0,4	2,6 ± 0,2	2,6 ± 0,4	2,6 ± 0,3	2,6 ± 0,2

* – разность средних величин по сравнению с предыдущими показателями статистически достоверна, P< 0,05.

avvb_2021_02.indd 42 26.06.2021 20:37:02

ном, а при использовании севофлурана на всем протяжении общей анестезии он практически не менялся. Такая динамика указывала на стабильность показателей газообмена при применении изофлурана и севофлурана. Таким образом, при проведении ингаляционной анестезии фторотаном снижение экономичности внешнего дыхания было наиболее выражено, что требовало дополнительных «вентиляционных затрат» на каждые 100 мл кислорода, потребленного животным на всех этапах общей анестезии.

Заключение

Проведенный количественный и качественный анализ параметров внешнего дыхания с учётом показателей кровообращения, газового состава крови и кислотно-основного состояния помогает оценить функциональную устойчивость респираторной системы лошадей при применении галогенсодержащих анестетиков, прогнозировать возможные нарушения легочного газообмена и выбрать оптимальный способ общей анестезии для лошадей.

Независимо от возраста, породы, экстерьерных особенностей животного использование для поддержания общей анестезии современных галогенсодержащих анестетиков (изофлуран, севофлуран) наиболее безопасно, так как вероятность развития нарушений легочного газообмена при этом значительно меньше, чем при применении фторотана.

Опыт проведения коррекции нарушений газообмена путём вспомогательной вентиляции лёгких у лошадей позволяет рекомендовать для этой цели легко изготовляемую дыхательную маску [12]. Проведенные исследования подтверждают мнение о том, что наиболее безопасным для лошадей является эндотрахеальный наркоз с применением портативной наркозно-дыхательной аппаратуры и современных галогенсодержащих ингаляционных анестетиков [1]. Такая тактика анестезиологической защиты уменьшает риск возникновения осложнений у животного и создаёт благоприятные условия для работы ветеринарного врача.

Список литературы

1. Берлин А. З. Аппарат и способ ингаляционной анестезии / А. З. Берлин, А. Ю. Нечаев, Л. Л. Николаев, Ян Папулак // Патент на изобретение 2729943 C1, 13.08.2020. Заявка № 201119254 от 20.06.2019.

2. Бетшарт-Вольфенсбергер Р. Ветеринарная анестезиология: учебное пособие/ Р. Бетшарт-Вольфенсбергер, А. А. Стекольников, А. Ю. Нечаев. – СПб.: Спец. лит, 2010. 270 с.

3. Нечаев А. Ю. Методика определения состояния вентиляции и кровотока у животных с помощью оксигемометрии / А. Ю. Нечаев // Материалы 54-й научной конференции молодых ученых и студентов: СПбГАВМ. СПб, 2000. С. 64–65.

4. Нечаев А. Ю. К возможности коррекции нарушений дыхания у животных при использовании общих анестетиков и седативных препаратов / А. Ю. Нечаев // Материалы 54-й научной конференции молодых ученых и студентов: СПбГАВМ. СПб, 2000. С. 65–66.

5. Нечаев А. Ю. К выбору анестезиологического обеспечения при диагностических и лечебных манипуляциях у лошадей / А. Ю. Нечаев // Материалы конференции профессорско-преподавательского состава СПбГАВМ. Санкт-Петербург, 2003. С. 76–78.

6. Общая анестезия и эвтаназия в ветеринарии: учеб. Пособие / Р. Бетшарт-Вольфенсбергер, А. А. Стекольников, К. В. Племяшов, А. Ю. Нечаев. СПб.: Проспект науки, 2017. 376 с.

7. Полатайко О. Р. Ветеринарная анестезия: практ. пособие / О. Р. Полатайко. Киев: «ВД «Перископ», 2009. 408 с.

8. Семенов Б. С. К выбору адекватного анестезиологического пособия при диагностических, лечебных и оперативных вмешательствах у лошадей / Б. С. Семенов, В. Н. Виденин, А. Ю. Нечаев, О. В. Балашова, В. А. Сорока // Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 80-летию со дня рождения профессора Э. И. Веремея «Актуальные вопросы и пути их решения в ветеринарной хирургии» Витебск, 2019. С. 75–76.

9. Стекольников А. А. Применение препаратов для наркоза при хирургических операциях у лошадей / А. А. Стекольников, А. В. Лебедев, М. А. Нарусбаева // Ветеринария. 1999. №1. С. 37–39.

10. Сорока В. А. Оценка функциональной устойчивости респираторной системы лошадей при применении галогенсодержащих анестетиков / В. А. Сорока, А. Ю. Нечаев // Материалы конференции профессорско-преподавательского состава СПбГУВМ. СПб, 2021. С. 97–99.

11. Сорока В. А. Особенности проведения общей анестезии жеребят / В. А. Сорока, А. И. Карклин, О. В. Балашова, А. Л. Смелкова // Международный вестник ветеринарии. 2021. №1. С. 359–366.

12. Сорока В. А. Дыхательная маска для лошадей / В. А. Сорока, А. Ю. Нечаев, К. В. Племяшов, О. В. Балашова, О. В. Романова // Патент на полезную модель 202204 U1, 05.02.2021. Заявка № 2020123662 от 10.07.2020.

avvb_2021_02.indd 43 26.06.2021 20:37:02

DOI: 10.24412/2074-5036-2021-2-44-47
УДК 636.2.034
Ключевые слова: хромота, процент оплодотворения, индекс стельности, программы синхронизации
Key words: limp, fertilization percentage, steelness index, synchronization programs

[1]Остриков Д. А., [2]Павленко О. Б., [3]Острикова Э. Е., [3]Кошляк В. В., [3]Жара М. Р.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ЗАБОЛЕВАНИЙ ДИСТАЛЬНОГО ОТДЕЛА КОНЕЧНОСТЕЙ И ВОСПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ КОРОВ

RELATIONSHIP BETWEEN DISTAL LIMB DISEASES AND COW REPRODUCTION

[1]Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский ветеринарный институт – филиал федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный Ростовский аграрный научный центр».
Адрес: Россия, 346421, Ростовская область, Новочеркасск, Ростовское шоссе, 0
North Caucasus Zonal Research Veterinary Institute – a branch of the federal state budgetary scientific institution "Federal Rostov Agrarian Scientific Center". Address: Russia, 346421, Rostov Region, Novocherkassk, Rostov Highway, 0
[2]ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I».
Адрес: Россия, 394087, г. Воронеж, ул. Мичурина, 1
Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great, Address: Russia, 394087, Voronezh, st. Michurina, 1
[3]ФГБОУ ВО «Донской государственный аграрный университет». Адрес: Россия, 346493, Ростовская область, Октябрьский район, поселок Персиановский, ул.Кривошлыкова, 24
Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Don State Agrarian University. Address: Russia, 346493, Rostov region, Oktyabrsky district, Persianovsky village, 24 Krivoshlykova street

Остриков Денис Алексеевич, аспирант. E-mail: e.ostrickova2018@yandex.ru
Ostrikov Denis Alekseevich, Post-graduate Student. E-mail: e.ostrickova2018@yandex.ru
Павленко Ольга Борисовна, доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры акушерства, анатомии и хирургии. E-mail: kobra_64.64@mail.ru
Pavlenko Olga Borisovna, Doctor of Biology Science, Associate Professor, Professor of Department of Obstetrics, Anatomy and Surgery. E-mail: kobra_64.64@mail.ru
Острикова Элеонора Евгеньевна, доктор сельскохозяйственных наук, доцент.
E-mail: e.ostrickova2018@yandex.ru
Ostrikova Eleonora Evgenievna, Doctor of Agricultural Sciences, Associate Professor. E-mail: e.ostrickova2018@yandex.ru
Кошляк Владимир Владимирович, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент.
E-mail: e.ostrickova2018@yandex.ru, тел. +79081842223
Koslyak Vladimir Vladimirovich, candidate PhD of Agricultural Ssciences, Associate Professor. E-mail: e.ostrickova2018@yandex.ru, тел. +79081842223
Жара Милана Романовна, студентка 4 курса факультета ветеринарной медицины.
E-mail: e.ostrickova2018@yandex.ru, тел. +79081953145
Zhara Milana Romanovna, 4th year Sstudent of the Faculty of Veterinary Medicine E-mail: e.ostrickova2018@yandex.ru, тел. +79081953145

Аннотация. в статье представлены результаты работы по изучению взаимосвязи заболеваний конечностей и воспроизводительной функции у коров. В результате проведенных исследований было установлено, что здоровые коровы затрачивали на время приема корма в 1,75 раза больше времени, чем животные с заболеваниями копыт. Это объясняется тем, что процесс стояния животного в ходе потребления корма у здоровых коров не вызывал болезненности в конечностях. Кроме того, здоровые коровы имели более высокую молочную продуктивность, чем их сверстницы из группы хромых, при этом хромые животные имели низкие показатели поедаемости корма, к концу эксперимента упитанность животных снизилась на 0,75 балла по сравнению с первоначальными показателями. Разница между хромыми и здоровыми животными в конце опыта составила 0,5 балла. При этом период от отела до плодотворного осеменения в группе хромых животных был в среднем на 39 дней длиннее, чем в группе здоровых животных. Процент выявления коров в охоте во второй группе был в 2,05 раза выше, чем среди хромых животных. В группе хромых животных процент оплодотворения был в 1,79 раза, а индекс стельности в 3 раза ниже, чем в группе здоровых животных. Полученные данные свидетельствуют, что у коров с заболеваниями конечностей из-за отрицательного энергетического баланса снижается процент выявления коров в охоте более, чем в 2 раза, индекс стельности за 21 день в 3 раза ниже, чем в группе здоровых коров.

avvb_2021_02.indd 44 26.06.2021 20:37:02

***Summary**: the article presents the results of work on the relationship between limb diseases and reproductive function in cows. As a result of the studies, it was found that healthy cows spent 1.75 times more time on feeding than animals with hoof diseases. This is due to the fact that the process of standing the animal during the consumption of feed in healthy cows did not cause soreness in the limbs. In addition, healthy cows had higher dairy productivity than their lame peers, while lame animals had low feed eating rates, and by the end of the experiment, animal fitness decreased by 0.75 points compared to the initial rates. The difference between lame and healthy animals at the end of the experience was 0.5 points. At the same time, the period from calving to fruitful insemination in the group of lame animals was on average 39 days longer than in the group of healthy animals. The detection rate of cows in hunting in the second group was 2.05 times higher than among lame animals. In the group of lame animals, the percentage of fertilization was 1.79 times, and the insularity index was 3 times lower than in the group of healthy animals. The obtained data indicate that in cows with limb diseases, due to the negative energy balance, the percentage of cows detected in hunting decreases by more than 2 times, the steeliness index for 21 days is 3 times lower than in the group of healthy cows.*

Введение

За последние годы в Российской Федерации повысился уровень заболеваемости дистального отдела конечностей у высокопродуктивных коров вследствие изменения технологии ведения животноводства, а именно: 1) механизации основных трудоемких процессов, таких как раздача кормов, водопой, навозоудаление, содержание животных без подстилки; 2) уменьшения в рационе доли грубых кормов [1].

Хромота крупного рогатого скота является одним из основных эндемических заболеваний, вызывающих проблемы со здоровьем и благополучием, а также производственные потери. Следовательно, количественная оценка воздействия болезни имеет кардинальное значение, чтобы подчеркнуть важность проблемы для промышленности и определить относительную рентабельность контрольных вмешательств [2].

Целью нашей работы явилось установление взаимосвязи между заболеваниями конечностей и воспроизводительной функцией у коров.

Материал и методы исследования

Исследования проводили в условиях животноводческого комплекса Сугоново ООО «Калужская Нива». В эксперименте участвовало 30 голов крупного рогатого скота голштинской породы, которых разделили на 2 группы. В первой группе содержались коровы с заболеваниями дистального отдела конечностей (ламинит, флегмона венчика), во второй группе – клинически здоровые коровы. Животных в группы отбирали с учетом возраста, количества лактаций. Опытным животным скармливали полнокомпонентный рацион, содержащий сырого протеина 16,0 %, крахмала 21,2 %. Продолжительность добровольного периода ожидания составил 50 дней. У животных подопытных групп изучали:

– количество потребляемого корма, кг/гол;

– этологические факторы проявления полового возбуждения;

– продолжительность сервис-периода, дн.;

Рассчитывали % осеменения и оплодотворяемости, а также индекс стельности за 21 день.

У животных подопытных групп изучали яркость проявления поведенческих реакций: частота подхода к кормовому столу, продолжительность поедания корма, частоту подходов к поилке.

Результаты исследований

В результате проведенных наблюдений было установлено, что здоровые коровы затрачивали на время приема корма в 1,75 раза больше времени, чем животные с заболеваниями копыт. Это объясняется тем, что процесс стояния животного в ходе потребления корма у здоровых коров не вызывал болезненности в конечностях. Кроме того, здоровые коровы имели более высокую молочную продуктивность, чем их сверстницы из группы хромых. Так как потребление корма у здоровых коров было больше, то и возросло потребление воды. В среднем количество подходов к поилке в группе здоровых животных составили – 15 раз, средняя продолжительность составила 18,26 мин, в группе хромых – 11 и 20,03 соответственно.

Период покоя у коров обеих групп был примерно одинаков и составлял в среднем 22 минуты. Время жвачки у коров подопытных

avvb_2021_02.indd 45 26.06.2021 20:37:02

Таблица 1

Поедаемость корма

Группа	Количество коров, гол	Масса розданного корма, кг	Масса остатков, кг	Количество остатков, %
1 группа (хр)	67	3195,0	326,8	10,23
2 группа (зд)	79	3790,0	233,1	6,15

групп разнилось. В группе хромых животных время, затраченное на жвачку составило 392 минуты, а в группе здоровых животных на 139 минут больше.

У хромых животных время, затраченное на отдых, было в среднем на 2,43 % больше, чем в группе здоровых животных.

Ежедневный анализ отчета программы WinMix показывает, что коровы из группы хромых имели более низкую поедаемость корма (таблица1).

Так как хромые коровы подходили к кормовому столу значительно реже, то относительная масса остатков корма в этой группе была на 4,1 % выше, чем у здоровых животных.

Нами была проведена оценка упитанности коров в начале и в конце эксперимента (таблица 2).

Так как хромые животные имели низкие показатели поедаемости корма, следовательно, к концу эксперимента упитанность животных снизилась на 0,75 балла по сравнению с первоначальными показателями. Разница между хромыми и здоровыми животными в конце опыта составила 0,5 балла. Критическими значениями в ООО «Калужская Нива» для коров дойного стала является показатель 2,75 балла. Коровы первой группы имели упитанность на 0,25 балла ниже критического значения.

Низкая поедаемость корма на фоне снижения упитанности коров свидетельствует об отрицательном энергетическом балансе.

Все коровы подопытных групп приняли участие в программе синхронизации Пресинх. Первая инъекция простогландина-2α была проведена в 36–42, вторая – в 50–56 дней после отела. Все пришедших в охоту коров осеменяли искусственно. Коровы, не пришедшие в охоту в течение 11 дней после повторной инъекции простогландина-2α, приняла участие в программе Овсинх. Полученный цифровой материал представлен в таблице 3.

Анализ полученных данных показывает, что период от отела до плодотворного осеменения в группе хромых животных был в среднем на 39 дней длиннее, чем в группе здоровых животных. Процент выявления коров в охоте во второй группе был в 2,05 раза выше, чем среди хромых животных. Это можно объяснить тем, что коровы с заболеваниями дистального отела конечностей не проявляли рефлекс неподвижности в стадии эструса из-за сильной болевой реакции.

В группе хромых животных процент оплодотворения был в 1,79 раза, а индекс стельности в 3 раза ниже, чем в группе здоровых животных. Возможно, причиной стали снижение уровня лютеинизирующего гормона и выход нежизнеспособных яйцеклеток из-за испытываемого хромыми животными отрицательного энергетического баланса.

Заключение

Как показали проведенные исследования процент выявления коров в охоте в группе

Таблица 2

Оценка упитанности коров (балл)

Группа	Упитанность	
	В начале опыта	В конце опыта
1 группа (хр)	3,25	2,50
2 группа (зд)	3,25	3,00

avvb_2021_02.indd 46 26.06.2021 20:37:02

Таблица 3

Основные показатели воспроизводства

Группа	Показатели воспроизводства			
	Сервис-период, дн	HR,%	CR,%	PR,%
Первая	137	35,0	24,0	10,0
Вторая	98	72,0	43,0	30,0

здоровых животных был в 2,05 раза выше, чем среди хромых коров. В группе хромых животных процент оплодотворения был в 1,79 раза, а индекс стельности в 3 раза ниже, чем в группе здоровых животных. Полученные данные свидетельствуют, что у коров с заболеваниями конечностей из-за отрицательного энергетического баланса снижается процент выявления коров в охоте более, чем в 2 раза, индекс стельности за 21 день в 3 раза ниже, чем в группе здоровых коров.

Своевременное проведение ФОК, нормализация кормления и содержания животных будет способствовать увеличению показателей воспроизводства до нормативных значений в хозяйстве.

Список литературы

1. Диденко А. Н. Забота о здоровье копыт повышает рентабельность животноводства / А. Н. Диденко // https://fermer.ru/content/zabota-o-zdorove-kopyt-povyshaet-rentabelnost-zhivotnovodstva

2. Павленко О. Б., Остриков Д.А. Сравнительная оценка показателей воспроизводства стада крупного рогатого скота / О. Б. Павленко, Д. А. Остриков // Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 180-летию ФГБОУ ВО «Донской государственный аграрный университет». 2020 . С. 128-–132.

DOI: 10.24412/2074-5036-2021-2-47-52
УДК 636.082.453.5
Ключевые слова: кролиководство, искусственное осеменение, приборы для искусственного осеменения, катетер.
Key words: rabbit breeding, artificial insemination, catheters, artificially acquired infertility

[1]Сысоева О. Е, [1]Миронова Л. П., [2]Сулейманов С. М., [2]Павленко О. Б.

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ УСТРОЙСТВА ДЛЯ ИСКУССТВЕННОГО ОСЕМЕНЕНИЯ КРОЛИКОВ В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННОГО ВОСПРОИЗВОДСТВА

IMPROVEMENT OF THE DEVICE FOR ARTIFICIAL INSEMINATION OF RABBITS IN THE CONDITIONS OF INDUSTRIAL REPRODUCTION IN ORDER TO PREVENT ARTIFICIALLY ACQUIRED INFERTILITY

[1]ФГБОУ ВО «Донской государственный аграрный университет». Адрес: Россия, 346493, Ростовская область, Октябрьский район, поселок Персиановский, ул.Кривошлыкова, 24
Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Don State Agrarian University". Russia, 346493, Rostov region, Oktyabrsky district, Persianovsky settlement, Krivoshlykova st., 24
[2]ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I». Адрес: Россия, 394087, г. Воронеж, ул. Мичурина, 1
Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great. Russia, 394087, Voronezh, st. Michurina, 1

Сысоева Оксана Евгеньевна аспирант, e-mail: oksanochka.sysoeva96@mail.ru
Sysoeva Oxana Evgenievna, Post-Graduate Student, e-mail: oksanochka.sysoeva96@mail.ru
Миронова Людмила Павловна, доктор ветеринарных наук, профессор. E-mail: mironova_lp@mail.ru
Mironova Lyudmila Pavlovna, Doctor of Veterinary Science, Professor. E-mail: mironova_lp@mail.ru

avvb_2021_02.indd 47 26.06.2021 20:37:02

Сулейманов Сулеман Мухитдинович, доктор ветеринарных наук, профессор. E-mail: suleimanov@list.ru
Suleimanov Suleman Mukhitdinovich, Doctor of Veterinary Science, Professor. E-mail: suleimanov@list.ru
Павленко Ольга Борисовна, доктор биологических наук, доцент, профессор. E-mail: kobra_64.64@mail.ru
Pavlenko Olga Borisovna, Doctor of Biological Sciences, Associate Professor. E-mail: kobra_64.64@mail.ru

Аннотация. Все более актуальной становится проблема организации воспроизводства кроликов в условиях промышленного комплекса в связи с активным развитием кролиководческой отрасли в России за последние годы. Для организации процесса искусственного осеменениясе необходимо подобрать наиболее удобный и качественный катетер для искусственного осеменения, так как от этого зависит эффективность процедуры. Современный рынок предоставляет широкий выбор различных устройств для введения семенной жидкости в половые пути самки. В ходе исследования был проведен анализ предлагаемой продукции и патентов на устройства. Часть предлагаемых катетеров универсальны и предлагаются для различных видов животных, в том числе и кроликов. Однако из-за особенности строения половой системы самки кролика необходимо учитывать некоторые требования к устройству. Целью исследования, описанного в статье, было разработать наиболее эффективную модификациюи катетера для искусственного осеменения кроликов. Наиболее простыми в эксплуатации, экономически выгодными и безопасными для кроликов оказались шприц-пистолет и катетер для искусственного осеменения, представленный трубкой длиной 16 см и частью для соединения с шприцом. В результате было выявлено, что на ряду с несомненными достоинствами этих моделей отмечается общий недостаток – травматизация родовых путей самки при введении в них устройства, при этом у новичков этот показатель составил 9 %, что в свою очередь приводило к экономическим потерям 54 655 тысяч рублей на 100 самок в 2020 году.

Согласно исследованию, было выявлено, что травматизация происходит из-за жёсткости материалов, применяемых для изготовления наконечников устройств для искусственного осеменения. При недостатке опыта осеминатора происходит пробуравливание стенок матки, нанесение ссадин и микротравм, которые в сочетании с микрофлорой влагалища и обсеменении инструментов для искусственного осеменения при нарушении правил антисептики приводит к развитию воспалительных процессов в половой системе самки и распространению инфекций на ферме. Кроме инфекций, передающихся половым путем угрозы представляет и условно патогенные микроорганизмы. Катетеры для искусственного осеменения часто одноразовые, но могут иметь и только сменные одноразовые насадки. Однако, в целях экономии практикуется многоразовое использование устройств, при этом методы дезинфекции не всегда оказываются эффективными. Согласно исследованиям, многие микроорганизмы способны выдерживать непрофессиональную стерилизацию.

Для предотвращения травматизации половых путей самки при проведении процедуры искусственного осеменения было предложено устройство для введения семенной жидкости, особенно подходящее начинающим кролиководам, осеминаторам. Устройство включает в своем строении мягкую и жесткую части, часть для соединения с шприцом. Мягкая часть представлена катетером Нелатона, выполненного из мягкого материала – поливинилхлорида. Для облегчения продвижения устройства имеется жесткая часть, выполненная из полиуретана. Обе части соединяются друг с другом при помощи нетоксичного ультрафиолетового клея. Мягкая часть закруглена в краниальном конце и при встрече с препятствием легко изгибается и меняет направление, тем самым полностью исключается возможность травматизации. Однако изгибы половых путей, неподходящая поза во время фиксации крольчихи могут затруднять продвижение устройства, для исключения подобных трудностей применяется жесткая часть, помогающая раздвигать мягкие ткани, которая не теряет форму.

Устройство имеет длину 25 см, но для предотвращения слишком глубокого введения катетера имеется круговая, устойчивая к воздействию влаги и дезинфицирующих средств метка на расстоянии 16 см от краниального конца. Именно это расстояние считается максимально допустимым для введения, хотя при затрудненном введении, вызванным, возможно, индивидуальными особенностями влагалища и матки крольчихи, не рекомендуется грубое введение.

Полезная модель способна соединяться с шприцами различного объема, имеющих стандартный адаптер, однако рекомендуется шприц объемом 1 мл, так как именно такая конфигурация будет наиболее удобной. При разведении семенной жидкости оптимальная концентрацияи спермиев для успешного искусственного осеменения содержится в одном миллилитре жидкости, кроме того, объем нужен для достаточного заполнения половых путей самки и механического продвижения половых клеток навстречу семяпроводам, тем самым увеличивая возможность эффективного оплодотворения.

Устройство рекомендовано для одноразового использования и имеет предусмотренную герметичную стерильную упаковку. Предварительно перед упаковыванием проводится стерилизация газом и ультрафиолетом, при этом достигается полная стерильность без повреждения материалов. После обработки устройства не токсичны и полностью безопасны в использовании.

Компоненты для изготовления устройства имеют низкую себестоимость, что делает его конечную цену доступной для рынка и не превышает стоимость уже представленных аналогов.

Технология использования устройства доступна каждому. Для этого адаптер шприца полностью вставляется в приспособленное для него отверстие, после чего краниальный конец трубки помещается в емкость с семенной жидкостью таким образом, чтобы боковые отверстия были полностью погружены. Поршень шприца оттягивается до необходимого объема для набора в него семенной жидкости. В это время ассистент по искусственному осеменению левой рукой раздвигает половые губы самки, в это же время правой рукой вводит катетер в половые пути

avvb_2021_02.indd 48 26.06.2021 20:37:02

крольчихи, не глубже нанесенной отметки, после чего нажатием поршня вводит семенную жидкость. Убедившись в попадании спермы в матку, специалист вынимает устройство из половых путей. Перед каждой процедурой осеменения катетер необходимо сменить на стерильный.

Summary. *The problem of the organization of reproduction of rabbits in the conditions of the industrial complex is becoming more and more urgent in connection with the active development of the rabbit breeding industry in Russia in recent years. To organize the process of artificial insemination, it is necessary to choose the most convenient and high-quality catheter for artificial insemination, since the effectiveness of the procedure depends on it. The modern market provides a wide range of different devices for the introduction of seminal fluid into the female genital tract. In the course of the study, an analysis of the proposed products and patents for the devices was carried out. Some of the proposed catheters are universal and are offered for various types of animals, including rabbits. However, due to the peculiarities of the structure of the female rabbit's reproductive system, it is necessary to take into account some requirements for the device. The aim of the study described in the article was to develop the most effective modification of the catheter for artificial insemination of rabbits. The simplest ones*

According to the study, it was found that traumatization occurs due to the rigidity of the materials used to make the tips of artificial insemination devices. With a lack of experience of the oseminator, the walls of the uterus are drilled, abrasions and microtraumas are inflicted, which, in combination with the vaginal microflora and the seeding of artificial insemination tools, in violation of the rules of antiseptics, leads to the development of inflammatory processes in the female's reproductive system and the spread of infections on the farm. In addition to sexually transmitted infections, the threat is also conditionally pathogenic microorganisms Catheters for artificial insemination are often disposable, but they can only have replaceable disposable nozzles. However, in order to save money, reusable devices are used, and disinfection methods are not always effective. According to research, many microorganisms are able to withstand unprofessional sterilization.

To prevent traumatization of the female genital tract during the artificial insemination procedure, a device for the introduction of seminal fluid was proposed, especially suitable for novice rabbit breeders, oseminators. The device includes in its structure a soft and hard part, a part for connecting to the syringe. The soft part is represented by a Nelaton catheter made of a soft material-polyvenyl chloride. To facilitate the movement of the device, there is a rigid part made of polyurethane. Both parts are connected to each other using a non-toxic UV glue. The soft part is rounded at the cranial end and when it meets an obstacle, it easily bends and changes direction, thereby completely eliminating the possibility of injury. However, the bends of the genital tract, an inappropriate position during the fixation of the rabbit can make it difficult to move the device, to avoid such difficulties, a rigid part is used to help push the soft tissues apart and does not lose its shape.

The device is 25 cm long, but to prevent too deep insertion of the catheter, there is a circular, moisture- and disinfectant-resistant mark at a distance of 16 cm from the cranial end. It is this distance that is considered the maximum permissible for administration, although in case of difficult administration, possibly caused by the individual characteristics of the vagina and uterus of the rabbit, rough administration is not recommended. The utility model is able to connect with syringes of various volumes having a standard adapter, but a 1 ml syringe is recommended, since this configuration will be the most convenient. When breeding seminal fluid, the optimal concentration of sperm for successful artificial insemination is contained in one milliliter of fluid, in addition, the volume is needed to sufficiently fill the female's genital tract and mechanically move the germ cells towards the vas deferens, thereby increasing the possibility of effective fertilization.

The device is recommended for single use and has a sealed, sterile packaging provided. Prior to packaging, gas and ultraviolet sterilization is carried out, while achieving complete sterility without damaging the materials. After processing, the devices are non-toxic and completely safe to use.

Components for the manufacture of the device have a low cost, which makes its final price affordable for the market and does not exceed the cost of the already presented analogues.

The technology of using the device is available to everyone. To do this, the syringe adapter is completely inserted into the hole adapted for it, after which the cranial end of the tube is placed in a container with seminal fluid so that the side holes are completely submerged. The plunger of the syringe is pulled to the required volume for the set of seminal fluid in it. At this time, the assistant with the left hand for artificial insemination pushes the labia of the female, at the same time with the right hand inserts a catheter into the genital tract of the rabbit, no deeper than the mark, and then presses the plunger to inject the seminal fluid. After making sure that the sperm enters the uterus, the specialist removes the device from the genital tract. Before each insemination procedure, the catheter must be changed to a sterile one.

Введение

Искусственное осеменение позволяет качественно проводить селекцию, снижает затраты на содержание самцов-производителей, предотвращает распространение инфекций.

Введение спермы в половые пути самки крольчихи производится при помощи специализированного катетера, представляющего собой трубку с механизмом для введения спермы.

В настоящее время существует большое количество модификаций данного устройства, применяемых для самок животных разных размеров, в том числе и крольчих [2].

avvb_2021_02.indd 49 26.06.2021 20:37:02

Одно из наиболее востребованных в современном кролиководстве устройство для осеменения спермой кролика, представляет собой шприц-пистолет (Рис. 1) со сменной насадкой для введения в половые пути и включает в своем строении трубку для осеменения, механизм для отсасывания семенной жидкости, цилиндр для хранения семенной жидкости и инъекционное устройство [1]. В зависимости от конструкции устройства для осеменения спермой кролика можно добиться точного количественного введения [3]. Удобство данного устройства связано с возможностью длительного непрерывного процесса искусственного осеменения, в связи с чем снижаются затраты времени на забор семенной жидкости в катетер. Однако устройство имеет и недостатки: жесткий стилет, способный травмировать половые пути самки и не подогреваемая емкость для семенной жидкости, что отрицательно сказывается на продолжительности жизни спермиев.

Кроме того, в практике кролиководства используются более упрощенного строения устройства, представляющие собой трубки (длина 250 мм, наружный диаметр 3 мм), которые при помощи проводника присоединяются к стерильному шприцу необходимого объема [5].

Таким образом, современный рынок предлагает ряд устройств, имеющих, как свои достоинства, так и недостатки. Одним из таких недостатков является частая травматизация половых органов крольчих в момент введения катетера, особенно это характерно для специалистов без достаточного опыта.

Материалы и методы

Была разработана модель для улучшения качества искусственного осеменения кроликов. Модель применяется для искусственного осеменения кроликов. Устройство снижает риск травматизации стенок половых путей самки, тем самым препятствуя развитию бесплодия и связанными с этим экономическими потерями. Достигается это благодаря использованию катетера из более мягкого, пластичного материала. Инструмент рекомендуется для однократного применения, после чего подлежит утилизации.

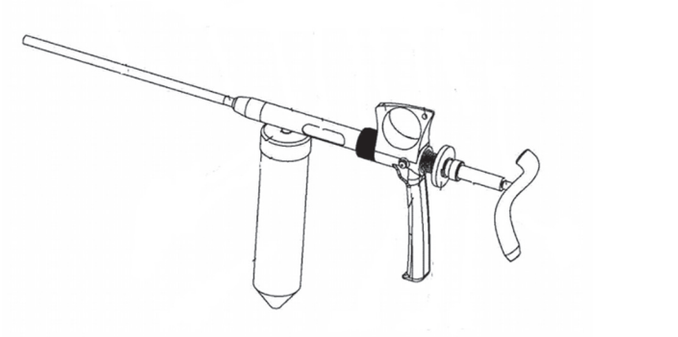

Рис. 1. Катетер для осеменения крольчих

Устройство состоит из трубки, длина которой составляет 27 см, выполненной из поливинилхлорида – материала нетоксичного, термопластичного, имеющего достаточно мягкую структуру, вследствие чего трубка способна изгибаться при встрече с препятствием. Вмещаемый объем жидкости 1,0 мл. Внутренний диаметр 2,7 мм, внешний 3,3 мм. Основой данной детали устройства для осеменения крольчих является урологический мужской катетер Нелатона размер 10 (черный) ГОСТ Р ИСО 8836-99, ГОСТ 3399-76, ГОСТ Р ИСО 10993.

Для облегчения прохождения и придания модели прочности в устройстве предусмотрен более плотный участок, выполненный из полиуретана (2) длиной 18 см и внешним диаметром 4,8 мм (трубки подобной конфигурации применяются в системах для гемотрансфузии).

Составные части полезной модели стерилизуются оксидом этилена и соединяются между собой клеем ультрафиолетового отвержения Permabond 4UV80 (3), дополнительное обеззараживание модели происходит при обработке УФ-лучами. Детали модели прочно скрепляются, чтобы под воздействием давления жидкости, поступающей из шприца, внутренняя трубка не меняла свое положение.

Краниальный конец трубки (4) закруглен, что также снижает риск нанесения травмы, и снабжен двумя боковыми отверстиями (5), увеличивающими площадь покрытия семенной жидкостью стенок матки крольчихи, вследствие чего повышается оплодотворяемость.

Для соединения с адаптером шприца в каудальной части предусмотрен участок с

avvb_2021_02.indd 50 26.06.2021 20:37:02

внутренним диаметром 3,4 мм и, внешним – 4,8 мм (6). Для предотвращения пробуравливания стенки матки при чрезмерно глубоком погружении устройства на расстоянии 16 см от краниального конца при помощи лазерной маркировки нанесена отметка (7), что соответствует среднему расстоянию от входа во влагалище самки до маточных труб.

Полезная модель подходит для работы с любыми моделями шприцов, однако рекомендуется использование инсулинового шприца со съемной иглой объемом 1,0 мл, так как при проведении процедуры искусственного осеменения по разным технологиям разведения вводят в половые пути самки от 0,5 до 1,0 мл спермы, что также соответствует объему катетера.

Для хранения усовершенствованной части устройства для искусственного осеменения кроликов предусмотрена стерильная индивидуальная упаковка.

При этом стоимость устройства не превышает стоимости прототипа, что связано с низкой стоимостью производных материалов.

Порядок использования

Инструмент работает следующим образом. Адаптер шприца полностью вставляется в приспособленное для него отверстие, после чего краниальный конец трубки помещается в емкость с семенной жидкостью таким образом, чтобы боковые отверстия были полностью погружены. Поршень шприца оттягивается до необходимого объема (при оттягивании поршня шприца в его полости и в катетере образуется отрицательное давление, и сперма всасывается в трубку).

Для осуществления процедуры оплодотворения крольчихи левой рукой техник по искусственному осеменению раздвигает половые губы самки, в это же время правой рукой вводит катетер в половые пути крольчихи, не глубже нанесенной отметки (7), после чего нажатием поршня вводит семенную жидкость в рог матки. Убедившись в попадании спермы в матку, специалист вынимает устройство из половых путей. Перед каждой процедурой осеменения катетер сменяется на стерильный.

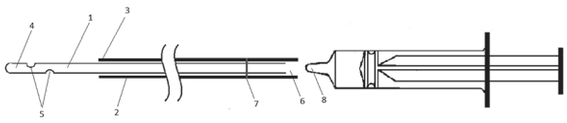

Рис. 2. Схема усовершенствованной модели прибора для искусственного осеменения крольчих

В настоящее время устройство для искусственного осеменения кроликов доставляют из Китая, Италии и Франции, их стоимость в интернет-магазине составляет в среднем от 12 до 15 рублей. Стоимость предлагаемого устройства не превышает стоимости прототипа, так как при производстве на территории России составных комплектующих частей затраты на транспортировку значительно снижаются. Усовершенствованная модель полезна также с точки зрения импортозамещения.

Заключение

Устройство предназначено для использования начинающими техниками по искусственному осеменению кроликов, не имеющими достаточного навыка, как на промышленных комплексах, так и для начинающих фермеров, обучающихся самостоятельно процедуре искусственного осеменения. Усовершенствованная модель поможет исключить потери, вызванные недостатком опыта. Усовершенствованная модель позволяет снизить экономические потери фермерам на 54 655 рублей на 100 осемененных самок, так как проведенные нами ранее исследования показали, что техники по искусственному осеменению кроликов с опытом до 6 месяцев, травмируют стенки половых путей крольчих в 9,0 % случаев [4].

Авторы хотели бы поблагодарить своих коллег за их вклад и поддержку в проведение исследования.

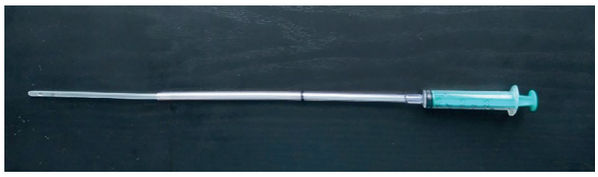

Рис. 3. Дизайн катетера

avvb_2021_02.indd 51 26.06.2021 20:37:02

Список литературы

1. Патент CN203263582U - 2013-04-18 устройство непрерывного осеменения кроликов // Фэн Гэбао, Чжоу Вэньфэн, Чжан Чжицюань, Ли Цзилин, Ли Шидонг, Ли Яньвэй, Ли Минъён, Цзяо Демингмут, Ван Чжаопэ.

2. Патент US20040199044A1 Шприц для искусственного осеменения // Стивен Верберкмоус, Энн Сум, AartDeKruif

3. Патент ES2207378B1-2005-08-01. Усовершенствованный катетер для искусственного осеменения кроликов // Хосе Мария, Сид Родригес

4. Сысоева, О. Е. Бесплодие крольчих, вызванное травматизацией родовых путей при искусственном осеменении / О. Е. Сысоева, О. А. Миронова // Актуальные проблемы и методические подходы к диагностике, лечению и профилактике болезней животных. Материалы международной научно-практической конференции, п. Персиановский. 2020. С. 97–101.

5. https://pan-krol.ru/catalog/tovary-dlya-krolikovodstva/iskusstvennoe-osemenenie.

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 2021 г. согласно инф. письму б/н от 03.09.18 г. НДС не облагается. Адрес подписки: ...»

Стоимость редакционной подписки на 2021 год:
2400 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

avvb_2021_02.indd 52 26.06.2021 20:37:02

DOI: 10.24412/2074-5036-2021-2-53-58
УДК: 619:616.995
Ключевые слова: мониезиоз, овцы, эритроциты, лейкоциты, гемоглобин, антигельминтные препараты
Key words: moniesiasis, sheep, erythrocytes, leukocytes, hemoglobin, anthelmintic drugs

Ахмед М. А., Захаркина Н. И., Пудовкин Н. А., Щербакова Е. Н.

ВЛИЯНИЕ АНТИГЕЛЬМИНТИКОВ НА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ОРГАНИЗМА ОВЕЦ, БОЛЬНЫХ МОНИЕЗИОЗОМ

THE EFFECT OF ANTHELMINTICS ON THE HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF THE BODY OF SHEEP WITH MONIESIASIS

ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет»
Адрес: 140056, г. Астрахань, ул. Татищева 20а
Astrakhan State University
Address: 140056, Astrakhan, st. Tatishcheva 20a

Ахмед Махмуд Абделхамид Махмуд, аспирант кафедры ветеринарной медицины.
E-mail: veterinaria-2011@mail.ru
Akhmed Makhmud Abdelhamid Mahmud, post-graduate student of the Department of Veterinary Medicine. E-mail: veterinaria-2011@mail.ru
Захаркина Наталья Ивановна, канд. биол. наук, доцент, доцент кафедры ветеринарной медицины.
E-mail: veterinaria-2011@mail.ru
Zakharkina Natalya Ivanovna, PhD of Biol. Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Veterinary Medicine. E-mail: veterinaria-2011@mail.ru
Пудовкин Николай Александрович, док. биол. наук, доцент, профессор кафедры ветеринарной медицины.
E-mail: niko-pudovkin@yandex.ru
Pudovkin Nikolay Alexandrovich, Doctor of Biol. Sciences, Associate Professor, Professor of the Department of Veterinary Medicine. E-mail: niko-pudovkin@yandex.ru
Щербакова Елена Николаевна, канд. биол. наук, доцент, доцент кафедры ветеринарной медицины.
E-mail: veterinaria-2011@mail.ru
Shcherbakova Elena Nikolaevna, PhD of Biol. Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Veterinary Medicine. E-mail: veterinaria-2011@mail.ru

Аннотация. В статье изложены результаты исследований по влиянию различных антигельминтных средств на морфологические показатели крови овец, больных мониезиозом. Все изучаемые препараты оказывают выраженное положительное влияние на гематологические показатели организма овец больных мониезиозом. Всего было отобрано 50 овец, больных естественным мониезиозом. Животных разделили на пять экспериментальных групп по 10 животных в каждой. Животным 1 группы вводили Альбен форте, группе 2 – Празивер, группе 3 – Альвет, группа 4 служила контролем с диагнозом мониезиоз (без лечения), группа 5 – здоровые животные. Установлено, что у больных животных наблюдается пониженный уровень гемоглобина на 11,8–12,8 % и эритроцитов на 31,04–25,10 % по сравнению со здоровыми животными. После 30-го дня лечения средний уровень гемоглобина начинает повышаться на 15,7 % (1 группа), 12 % (2 и 3 группа), также повышается количество эритроцитов на 44,8 % (1 группа), 35,6 % (2 группа) и 29 % (3 группа). У животных 4 группы (без лечения) происходит постепенное снижение гемоглобина и эритроцитов до 40,1 % и 37 % соответственно по сравнению с первоначальным уровнем. Скорость оседания эритроцитов у больных животных в 1,71–2,14 раза выше, чем у здоровых животных. После лечения изучаемыми препаратами СОЭ уменьшается на 30 сутки на 84,34 % (1 группа), 34,8 % (2 группа), 51,32 % (3 группа). У больных животных установлен лейкоцитоз. После 30 дней лечения наблюдалось постепенное снижение значений лейкоцитов на 39,4–61,5%, в то время как уровни лейкоцитов у животных 4 группы продолжали увеличиваться (+ 12,4 %). Количество эозинофилов, в экспериментальных группах было выше на 52–97,6 %, чем у животных в 5 группе. Уровень эозинофилов у животных, подвергнутых лечению, вернулся к норме, тогда как у животных 4 группы количество эозинофилы стало в 2,07 раза выше, чем у здоровых животных.

Summary. *The article presents the results of studies on the effect of various anthelmintic agents on the morphological parameters of the blood of sheep with moniesiasis. All studied drugs have a pronounced positive effect on the hematological parameters of the body of sheep with moniesiasis. A total of 50 sheep infected with natural moniesiasis were selected. The animals were divided into five experimental groups of 10 animals each. Group 1 was injected with Alben Forte, group 2 – Praziver, group 3 – Alvet, group 4 – served as a control with a diagnosis of moniesiasis (without treatment), group 5 – healthy animals. It was found that sick animals have a reduced level of hemoglobin by*

avvb_2021_02.indd 53 26.06.2021 20:37:02

11.8–12.8 % and erythrocytes by 31.04–25.10 % compared to healthy animals. After the 30th day of treatment, the average hemoglobin level begins to increase by 15.7 % (group 1), 12 % (groups 2 and 3), the number of erythrocytes also increases by 44.8 % (group 1), 35.6 % (group 2) and 29 % (group 3) respectively. In animals of group 4 (without treatment), there is a gradual decrease in hemoglobin and erythrocytes to 40.1 % and 37 %, respectively, compared with the initial level. The erythrocyte sedimentation rate in sick animals is 1.71–2.14 times higher than in healthy animals. After treatment with the studied drugs, ESR decreases by 30 days by 84.34 % (group 1), 34.8 % (group 2), 51.32 % (group 3). Sick animals have leukocytosis. After 30 days of treatment, there was a gradual decrease in leukocyte counts by 39.4–61.5 %, while leukocyte levels in animals of group 4 continued to increase (+ 12.4 %). The number of eosinophils in the experimental groups was 52–97.6 % higher than in animals in group 5. The level of eosinophils in treated animals returned to normal, while in animals of group 4 the number of eosinophils became 2.07 times higher than in healthy animals.

Введение

Овцеводство в России – это специализированная отрасль животноводства с богатым генофондом, насчитывающая около 40 пород и породных групп [4]. Астраханская область, расположенная на юге европейской части России, является регионом традиционного развития овцеводства. Разведение мелких жвачных животных требует сравнительно небольших затрат, по сравнению с разведением крупного рогатого скота. Основными продуктами овцеводства и козоводства являются молоко, мясо и шерсть [4].

Огромный ущерб овцеводству в России и других странах наносят кишечные гельминтозы, особенно аноплоцефалидозы, широко распространенные на территории России. В некоторых регионах страны уровень зараженности животных этими паразитами достигает 60–100 % [2]. Одними из наиболее распространенных паразитов у овец, являются цестоды семейства *Anoplocephalidae*, наиболее широко распространенным представителями которого являются цестоды из рода *Moniezia* [1].

В настоящее время на рынке ветеринарных препаратов доступен ряд антигельминтных средств широкого спектра действия, производители которых заявляют об их высокой эффективности против паразитов домашних животных и в частности овец. Однако степень эффективности их действия против различных видов гельминтов требует дополнительного изучения с учетом различных климатических условий и типа содержания животных.

Целью нашего исследования является изучение влияние различных ангельминтиков на морфологические показатели крови овец.

Материалы и методы

Исследование проводили на факультете ветеринарной медицины Астраханского государственного университета. Производственный опыт проводили в Астраханской области, Лиманском районе, в селе Песчаное. Всего было отобрано 50 овец, инфицированных естественным мониезиозом, в возрасте 3 лет, с массой тела 43±1,6 кг. После нумерации с помощью ушных бирок и взвешивания животных разделили на пять экспериментальных групп по 10 животных в каждой. Группе 1 (Г1) вводили Альбен форте, группе 2 (Г2) – Празивер, группе 3 (Г3) – Альвет, группа 4 (Г4) служила контролем с диагнозом мониезиоз (без лечения), группа 5 (Г5) – здоровые животные. Схема эксперимента представлена в таблице 1.

Таблица 1

Схема опыта

Группа животных	Название препарата и действующее вещество	Доза и способ применения
1 группа	Альбен форте (Альбендазол и Оксиклозанид)	1мл/5кг массы тела перорально
2 группа	Празивер (Празиквантел и Ивермектин)	0,4 мл/кг массы тела. перорально
3 группа	Альвет 10% суспензия (Альбендазол)	0,5мл/5кг массы тела. перорально
4 группа	Контрольная группа (больные животные)	Лечение не проводилось
5 группа	Контроль (здоровые животные)	Лечение не проводилось

avvb_2021_02.indd 54 26.06.2021 20:37:02

Образцы крови и фекалий овец всех групп собирали на нулевой, 7-й, 17-й и 30-й день лечения. Для гематологических исследований кровь собирали в стерильные пробирки с добавлением динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты в качестве антикоагулянта из расчета 1 мг/5 мл крови. Оценивали концентрацию гемоглобина, эритроцитов, скорость оседания эритроцитов, лейкоцитов и дифференциальное количество лейкоцитов.

Свежие образцы фекалий собирали непосредственно из прямой кишки овец и хранили в пластиковых контейнерах, содержащих 10 % формалин. Качественное исследование проводилось на наличие яиц *Moniezia spp*. Количественные исследования образцов фекалий *Moniezia spp* были выполнены в течение 48 часов после сбора с использованием модифицированной методики Макмастера для подсчета (EPG) [9].

Статистический анализ данных, относящихся к различным параметрам, проводился с использованием компьютерной программы SPSS v.20 (IBM, США).

Результаты исследований и обсуждение

Изменения различных гематологических показателей овец, инфицированных мониезиозом, в разные промежутки времени в разных группах лечения, представлены в таблице 2.

Установлено, что до лечения (0 день), было отмечено значительное снижение количества гемоглобина (Hb) и эритроцитов во всех группах по сравнению со здоровой группой (Г5). У животных 4 группы среднее содержание гемоглобина до лечения составило 80,7±1,2 (г/л), далее происходило постепенное снижение до 77,6±1,1 и 73,9±0,8 (г/л) на 17-й и 30-й дни (таблица 2).

Уровень гемоглобина в группах зараженных был на 11,8–12,8 % ниже, чем у здоровых овец, а уровень эритроцитов был на 31,04–25,10 % ниже, чем у здоровых животных. После 30-го дня лечения среднее содержание эритроцитов у овец 4 группы снизились до 37 %. Это снижение может быть связано с кровопотерей из-за обширного повреждения тканей стенки кишечника, а также с повышенной секрецией и плохой абсорбцией

Таблица 2

Гематологические изменения у овец больных мониезиозом в различные промежутки времени, в зависимости от эффективности антигельминтных средств

Параметры	Время (дни)	Группы животных				
		Г1	Г2	Г3	Г4	Г5
Hb, (г/л)	0	81,4±2,1*	81,0±2,1*	81,5±1,9*	80,7±1,2*	92,5±0,4
	7	86,4±0,6	83,3±0,6*	82,4±1,5*	80,7±0,7*	93,8±0,7
	17	91,9±1,8	86,8±1,5*	84,9±1,4*	77,6±1,1*	94,4±0,8
	30	94,2±0,3	90,7±1,3	91,3±0,6	73,9±0,8	94,1±0,6
Эритроциты, (10^{12}/л)	0	6,74±0,48*	6,73±0,49*	6,91±0,39*	7,31±0,81*	9,76±0,08
	7	8,46±0,31*	7,86±0,41*	7,54±0,36*	6,23±0,29*	9,84±0,03
	17	9,24±0,15	8,56±0,39*	8,02±0,29*	5,61±0,45*	9,79±0,06
	30	9,76±0,25	8,99±0,37	8,91±0,42*	4,61±0,40*	9,86±2,01
Лейкоциты (10^{9}/л)	0	6,96±0,16*	6,51±0,72*	6,30±0,40*	6,68±0,31*	4,11±0,02
	7	6,73±0,39*	6,33±0,72*	6,07±0,54*	6,57±0,47*	4,18±0,08
	17	4,82±0,56*	5,49±0,29*	5,16±0,62*	7,02±0,43*	4,35±0,27
	30	4,31±0,29	4,67±0,32	4,36±0,28	7,51±0,33	4,13±0.03
СОЭ (мм/ч)	0	4,24±0,27*	4,11±0,68*	4,91±0,84*	3,92±0,44*	2,29±0,03
	7	3,28±0,33*	3,41±0,31*	4,06±0,81*	4,80±0,35*	2,23±0,07
	17	2,86±0,40*	3,12±0,44*	3,95±0,57*	5,39±0,37*	2,25±0,08
	30	2,30±0,07	2,68±0,34	2,39±0.17	6,27±0,63*	2,33±0.06

* $p \leq 0,05$ – достоверность различий относительно здоровых животных (Г5) (здесь и далее).

avvb_2021_02.indd 55 26.06.2021 20:37:02

в кишечнике из-за присутствия взрослых паразитов. Снижение уровня гемоглобина в эритроцитах понижает способность крови переносить кислород, что приводит к появлению симптомов анемии и может привести к смерти на более поздних стадиях [6]. После 30-го дня лечения средний уровень гемоглобина значительно увеличивался у овец в Г1, Г2 и Г3 на 15,7 %, 12 % и 12 % соответственно, а количество эритроцитов в Г1, Г2 и Г3 на 44,8 %, 35,6 % и 29 % соответственно. Что касается значений СОЭ, то было обнаружено, что до лечения в экспериментальных группах (Г1, Г2, Г3 и Г4) оно было в 1,71–2,14 раза выше, чем у здоровых животных (Г5). У овец 4 группы к концу эксперимента значение СОЭ было в 2,9 раза выше чем у здоровых животных из группы 5. Через 30 дней лечения уровень СОЭ снизился у овец из Г1, Г2 и Г3 на 84,34 %, 34,8 %, 51,32 % соответственно.

Установлено значительное увеличение общего количества лейкоцитов у овец, зараженных мониезиозом (Г1, Г2, Г3 и Г4), по сравнению с контрольной группой (Г5). До лечения количество лейкоцитов в Г5 составляло 4,11±0,02 (10^9/л) и оставалось в пределах физиологических значений: 4,18±0,08, 4,35±0,27 и 4,13±0,03 (10^9/л) на 7-й, 17-й и 30-й дни соответственно, но в экспериментальных группах овец (Г1, Г2, Г3 и Г4) количество лейкоцитов значительно увеличилось и составило 6,96±0,16, 6,51±0,72, 6,30±0,40 и 6,68±0,31 (10^9/L). После 30 дней лечения наблюдалось постепенное снижение значений лейкоцитов в Г1, Г2 и Г3, на 61,5 %, 39,4 % и 44,5 %) соответственно, в то время как уровни лейкоцитов в Г4 продолжали увеличиваться (+ 12.4 %).

Установлено, что до лечения количество эозинофилов в экспериментальных группах (Г1, Г2, Г3 и Г4) было выше на 52–97,6 %, чем у животных в 5 группе. Уровень эозинофилов в Г1, Г2, Г3 вернулся к норме к концу эксперимента с процентным соотношением 55,4 %, 45,7 % и 50,9 % соответственно, тогда как у животных 4 группы количество эозинофилов стало в 2,07 раза выше, чем у животных 5 группы. Через 30 дней произошло снижение уровня эозинофилов у животных в Г1, Г2 и Г3 на 55,4 %, 45,7 %, 50,9 % соответственно.

Лейкоцитоз у овец, зараженных мониезиозом, может быть вызван стимуляцией лимфоидных тканей и стволовых клеток костного мозга паразитами и их токсинами. Эозинофилия может быть связана с реакцией организма хозяина на паразита или может быть связана с чувствительностью хозяина к секреторным продуктам паразита [7]. Более того, эозинофилы могут фагоцитировать комплекс антиген-антитело и играть важную роль в защитном механизме организма хозяина против паразита. Эозинофилы – это многофункциональные противовоспалительные лейкоциты, участвующие в патогенезе, аллергических реакциях и участвующие в защите от гельминтозов [8].

После окончания лечения уровни нейтрофилов вернулись к нормальным уровням во всех группах, получавших антигельминтные средства, но у больных животных (Г4) концентрация нейтрофилов увеличилась на 8,7 %. Что касается уровня незрелых нейтрофилов в опытных группах, то до лечения он был в 1,7 раза выше, чем их уровень у животных 5 группы. Уровни незрелых нейтрофилов в Г1, Г2 и Г3 возвращались к нормальным значениям только к концу эксперимента. Нейтрофилия зарегистрирована во всех группах больных мониециозом овец, что может быть связано с вторичными бактериальными инфекциями. Нейтрофилы первыми проникают к месту острой воспалительной реакции, и характеризуются своей способностью действовать как фагоцитарные клетки, высвобождать литические ферменты и продуцировать активные формы кислорода с антимикробным потенциалом [5]. Перед лечением у всех групп овец, больных мониезиозом, регистрировалась лимфоцитопения, что могло быть связано с системным стрессом и иммуносупрессией из-за инвазии. После введения антигельминтных средств на 17-й день были отмечены улучшения в Г1 (39,1 %), Г2 (33,7 %), Г3 (25,9 %).

Заключение

Таким образом, все изучаемые препараты оказывают выраженное положитель-

avvb_2021_02.indd 56 26.06.2021 20:37:03

Таблица 3

Изменения лейкоцитарной формулы крови овец, больных мониезиозом, в различные промежутки времени, в зависимости от эффективности антигельминтных средств

Параметры	Время	Группы животных				
		Г1	Г2	Г3	Г4	Г5
Эозинофилы, (%)	0	5,02±0,73*	4,83±0,65*	4,26±0,42*	3,86±0,37*	2,54±0,20
	7	3,72±0,26*	3,65±0,35*	3,99±0,09*	4,55±0,45*	2,63±0,14
	17	2,28±0,17	3,04±0,63*	3,54±0,31*	5,17±0,29*	2,49±0,06
	30	2,24±0,13	2,62±0,29	2,27±0,21	5,38±0,51*	2,59±0,10
Базофилы, (%)	0	0,56±0,15*	0,54±0,05*	0,46±0,05*	0,46±0,09*	0,34±0,05
	7	0,38±0,08*	0,34±0,05*	0,36±0,05*	0,52±0,08*	0,27±0,04
	17	0,24±0,05	0,26±0,05	0,28±0,46	0,42±0,11*	0,24±0,54
	30	0,22±0,04*	0,22±0,04*	0,24±0,05*	0,50±0,10*	0,30±0,07
Сегменто-ядерные нейтрофилы, (%)	0	36,84±0,8*	36,93±0,8*	36,81±1,2*	34,99±1,2*	20,94±1,2
	7	34,24±0,7*	31,26±3,7*	27,23±1,2*	37,19±0,7*	20,00±0,3
	17	29,78±2,0*	25,53±2,5*	23,84±1,0	40,53±1,1*	21,50±1,1
	30	20,68±0,6	20,78±1,2	20,66±2,0	42,21±0,7*	20,17±0,9
Незрелые нейтрофилы, (%)	0	5,76±0,43*	5,16±0,59*	4,02±0,83*	5,22±0,45*	2,27±0,05
	7	4,35±0,30*	4,56±0,37*	3,57±0,71*	5,37±0,75*	2,32±0,07
	17	2,47±0,40	3,23±0,65*	3,02±0,31*	5,62±0,48*	2,29±0,08
	30	2,58±0,35	2,25±0,31	2,20±0,04	6,05±1,08*	2,35±0,04
Лимфоциты, (%)	0	34,19±0,7*	36,42±0,9*	37,08±1,2*	37,84±0,9*	52,65±0,7
	7	35,78±1,9*	38,03±1,8*	41,04±0,8*	37,86±0,9*	51,85±1,7
	17	47,57±1,9*	48,68±1,1*	46,70±1,2*	36,89±1,1*	53,26±2,4
	30	52,84±0,8	51,86±2,3	49,75±2,0	29,50±1,1*	51,38±2,5
Моноциты, (%)	0	2,18±0,39*	2,15±0,18*	1,95±0,18*	1,18±0,29*	1,53±0,32
	7	1,98±0,26*	2,08±1,87*	1,45±0,40*	1,24±0,44*	1,56±0,23
	17	1,35±0,14	1,97±0,14	1,17±0,05*	1,61±0,37	1,79±0,13
	30	1,10±0,04*	2,06±0,16	1,06±0,01*	1,16±0,16*	2,02±0,14

* $p \leq 0,05$ – достоверность различий относительно здоровых животных (Г5).

ное влияние на гематологические показатели организма овец, больных мониезиозом. У больных животных наблюдается пониженный уровень гемоглобина на 11,8–12,8 % и эритроцитов на 31,04–25,10 % по сравнению со здоровыми животными. После 30-го дня лечения средний уровень гемоглобина повышался на 15,7 % (1 группа), 12 % (2 и 3 группа), так же повышалось и количество эритроцитов на 44,8 % (1 группа), 35,6 % (2 группа) и 29 % соответственно (3 группа). У животных 4 группы (без лечения) происходило постепенное снижение гемоглобина и эритроцитов до 40,1 % и 37 % соответственно, по сравнению с первоначальным уровнем. Скорость оседания эритроцитов у больных животных была в 1,71–2,14 раза выше, чем у здоровых животных. После лечения изучаемыми препаратами, показатель СОЭ уменьшался на 30 сутки на 84,34 % (1 группа), 34,8 % (2 группа), 51,32 % (3 группа). Кроме того, у больных животных был выявлен лейкоцитоз. После 30 дней лечения наблюдалось постепенное снижение значений лейкоцитов на 39,4–61,5 %, в то время как уровень лейкоцитов у животных 4 группы продолжал увеличиваться (+ 12,4 %). Количество эозинофилов, у животных экспериментальных групп было выше на 52–97,6 %, чем у животных в 5 группе. Уровень эозинофилов у овец, подвергнутых лечению, вернулся к норме, в отличие от животных 4

avvb_2021_02.indd 57 26.06.2021 20:37:03

группы у которых количество эозинофилов стало в 2,07 раза выше, чем у здоровых животных.

Список литературы

1. Атаев А. М. Биогеография цестод *Moniezia expansa* и *Moniezia benedeni* у овец в регионе Северного Кавказа / А. М. Атаев, И. Х. Махова // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. 2008. № 1. С. 148–151.

2. Белова Е. Е. Распространение аноплоцефалятозов овец в Самарской области с учетом зональных особенностей / Е. Е. Белова // Российский паразитологический журнал. 2011. № 1. С. 50–53.

3. Жиряков А. М. Состояние и перспективы развитие цигайского овцеводства в Российской Федерации / А. М. Жиряков, В. П. Лушников, Л. Н. Григорян, С. А. Хатаев // Овцы, козы, шерстяное дело. 2018. № 3. С. 7–10.

4. Лушников В. П. К вопросу породного состава овцеводства в Саратовской области // В. П. Лушников, А. В. Молчанов // Овцы, козы, шерстяное дело. 2018. № 3. С. 3–5.

5. Шутова Т. И. Влияние препарата Миртазапин на морфологию крови кошек / Т. И. Шутова, Н. А. Пудовкин, В. В. Салаутин // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н. Э. Баумана. 2018. Т. 235. № 3. С. 194–197.

6. Abdelhamid M. Combined effect of monieziosis and hypomicroelementosis on some hematological, biochemical and hormonal parameters in Merino sheep / M. Abdelhamid, V. I. Vorobiev, M. L. Lapteva, A. K. Dyab // Pak Vet J. 2021. V. 41(1). P. 107–111.

7. Huang L. Eosinophils in helminth infection: defenders and dupes / L. Huang, J. A. Appleton // Trends Parasitol. 2016. V. 32. P. 798–807.

8. Klion A. D. The role of eosinophils in host defense against helminth parasites / A. D. Klion, T. B. Nutman // J Allergy Clin Immunol. 2004. V. 113. P. 30–37.

9. Soli F. Efficacy of copper oxide wire particles against gastrointestinal nematodes in sheep and goats / F. Soli, T. H. Terrill, S. A. Shaik, W. R. Getz, J. E. Miller, M. Vanguru, J. M. Burke // Veterinary parasitology. 2010. V. 168 (1–2). P. 93–96.

DOI: 10.24412/2074-5036-2021-2-58-62
УДК: 639.3.09:576.895.3
Ключевые слова: осетр (*Acipenser baerii Brandt*, 1869), крустацеозы (*Crustaceosis*), аргулез (*Argulus*), Эмикон®, кормолекарственная смесь, эффективность.
Key words: sturgeon, crustaceosis, Argulus, Emicon®, medicated feed mixture, efficiency.

[1]Корсакова М. В., [1]Енгашев С. В., [2]Гончарова М. Н.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА ЭМИКОН® ПРИ АРГУЛЕЗЕ ЛЕНСКИХ ОСЕТРОВ (*ACIPENSER BAERII BRAND*, 1869)

THERAPEUTIC EFFICACY OF EMICON® AGAINST FISH ARGULOSIS AT SIBERIAN STURGEON (ACIPENSER BAERII BRAND, 1869)

[1]ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии-МВА имени К. И. Скрябина». 109472, Россия, Москва, ул. Академика Скрябина, 23
Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Scriabin. Russia, Moscow, Academician Scriabin street, 23
[2]ООО «НВЦ Агроветзащита». 129329, Россия, Москва, Игарский проезд, д. 4, стр. 2
NVT Agrovetzaschita. 129329, Russia, Moscow, Igarsky passage, 4, parade 2

Корсакова Мария Валерьевна, аспирант кафедры паразитологии и ветеринарно-санитарной экспертизы. E-mail: masha.korsakova.94@mail.ru.
Korsakova Maria Valeryevna, Postgraduate student of the Department of parasitology and veterinary sanitary expertise. E-mail: masha.korsakova.94@mail.ru
Енгашев Сергей Владимирович, д. в. н., профессор, академик РАН. E-mail: sve@vetmag.ru.
Engashev Sergey Vladimirovich, Doctor of Veterinary Science, Professor, academician of the RAS. E-mail: sve@vetmag.ru.
Гончарова Маргарита Николаевна, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник. E-mail: mgoncharova@vetmag.ru
Goncharova Margarita Nikolaevna, PhD of Veterinary Sciences, Senior Scientist. E-mail: mgoncharova@vetmag.ru

avvb_2021_02.indd 58 26.06.2021 20:37:03

Аннотация. Аргулёз осетровых рыб – паразитарное заболевание, вызываемое жаброхвостыми рачками рода *Argulus*, которые наносят значимый экономический ущерб, связанный с отходом рыб вследствие неблагоприятного воздействия на их организм и развитием вторичных инфекций в условиях искусственного выращивания. Вспышка заболевания отмечена у половозрелых особей ленских осетров (*Acipenser baerii Brand*, 1869) в тепловодном бассейновом хозяйстве. Применение нового лекарственного препарата Эмикон® в дозе 0,05 г/кг массы рыб с кормом 7 дней подряд позволило выявить его высокую эффективность при аргулёзе ленских осетров. Побочных явлений, осложнений, нежелательных реакций после применения лекарственного препарата не отмечено.

Summary. *Sturgeon argulosis – is a parasitic disease caused by Branchiurans of Argulus Genus, that cause significant economic damage expressed in fish loss due to adverse impact on fish organism and development of consecutive infections in artificial conditions. The disease outbreak was noted at eugamic individuals of siberian sturgeon (Acipenser baerii, Brandt, 1869) living in fish farming warmwater tank. Application of a new drug Emicon® at a dosage of 0,05 g/kg of fish mass during the period of 7 days has shown high efficacy against fish argulosis at siberian sturgeon. Side effects, complications, unwanted reactions were not revealed after the drug application.*

Введение

В современных условиях сокращения природных популяций осетровых рыб возрастает роль и значение аквакультуры, основными направлениями которой являются искусственное воспроизводство и товарное выращивание осетровых [2].

Известно, что интенсификация аквакультуры сопряжена с рядом негативных лимитирующих факторов, среди которых одним из главных являются болезни. В осетроводстве гибель рыб от заболеваний нередко доходит до 40 % и более [5].

Паразитические ракообразные рода *Argulus*, относятся к одним из наиболее патогенных паразитов осетровых. Аргулёз может вызывать значительный отход рыб вследствие неблагоприятного воздействия на их организм и развития вторичной инфекции при заводском получении и товарном выращивании [6]. Считалось, что заболевание бóльшую опасность представляет для молоди осетровых, а рыбы старших возрастных групп являются носителями [5]. Но в условиях тепловодного индустриального бассейнового хозяйства вспышки аргулёза отмечены и у половозрелых особей разных видов сибирских осетровых рыб, преимущественно во второй половине лета. Заражение аргулёзом может происходить с поступлением личиночных стадий паразитов вместе с водой из источников водоснабжения. В бассейнах имеются благоприятные условия для их роста, развития и размножения. Распространение рачков также может происходить через рыбоводный инвентарь, так как они способны прикрепляться к дели сачка и свободно попадать из одного бассейна в другой при различных манипуляциях рыбовода [3, 7].

Профилактика аргулёза в основном базируется на недопущении инвазионного начала в хозяйство. При бассейновом выращивании используют антирачковые фильтры на водоподаче [5]. Но, по ряду причин экономического и технического характера такие профилактические мероприятия, как правило, недостаточно успешны. В отечественной и зарубежной рыбоводной практике длительное время в качестве наиболее действенных средств, способных уничтожать взрослых, продуцирующих яйца самок рачков, применяли хлорофос и карбофос [1, 9]. Однако их использование трудоемко и может представлять опасность для рыб, персонала и окружающей среды из-за высокой токсичности этих средств. Для борьбы с аргулёзом осетровых при бассейновом содержании применение хлорофоса вследствие его недостаточной эффективности и короткого срока действия лишь частично сдерживает развитие возбудителей болезни [4]. Применение марганцевокислого калия также мало эффективно, так как он способствует отпадению рачков от рыб, но не вызывает их гибели [5]. Поэтому в настоящее время существует потребность в новых эффективных терапевтических средствах.

Компанией ООО «Научно-внедренческий центр Агроветзащита» разработан и предложен для испытаний при крустацеозах рыб новый лекарственный препарат Эмикон®, который уничтожает рачков на всех стадиях развития и обладает продолжительным периодом действия.

avvb_2021_02.indd 59 26.06.2021 20:37:03

Целью исследования послужила оценка эффективности действия препарата Эмикон® при аргулезе ленских осетров.

Материалы и методы

Производственный опыт по испытанию препарата Эмикон® при аргулёзе ленских осетров был проведен на Конаковском заводе товарного осетроводства в Тверской области в июле 2019 г.

Для проведения исследования в хозяйстве было задействовано 47 экземпляров осетров ремонтно-маточного стада массой от 8 до 15 кг, возраст которых составлял 10–12 лет. Рыбы содержались в 4 бассейнах, в каждом из которых находилось от 9 до 16 осетров. Температура воды во время проведения опыта составила 18,5–20 ºС, количество кислорода в воде – 7,2–8 мг/л. Мы сформировали три подопытных и одну контрольную группы. Первая – девять осетров – получала препарат Эмикон® в дозе 0,025 г/кг, вторая – 12 осетров – в дозе 0,05 г/кг и третья (16 рыб) – в дозе 0,1 г/кг. Осетры контрольной группы (10 особей) получали обычный комбикорм.

Уровни заражения аргулёзом определяли путем подсчета рачков на поверхности тела у рыб во всех 4 бассейнах. Систематическую принадлежность рачков изучали, используя бинокулярный микроскоп и «Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР» (1987) [8]. Паразитологическое обследование рыб подопытных и контрольной групп проводили за 2 дня до применения препарата и через 14 дней после начала эксперимента. За рыбой вели наблюдение в течение всего опыта. Обращали внимание на активность рыб, потребление ими корма, наличие или отсутствие осложнений, побочных явлений, нежелательных реакций. Лекарственный препарат Эмикон® рыбе задавали в виде кормолекарственной смеси.

При изготовлении кормолекарственной смеси препарат постепенно смешивали с кормом, затем добавляли подсолнечное масло в количестве 1 % от массы корма и перемешивали до равномерного его распределения по поверхности гранул. Полученную смесь скармливали осетрам согласно принятой в хозяйстве технологии кормления 1 раз в день в составе суточной нормы корма, которая составляла 0,33–0,4 % от массы рыб. Во всех бассейнах рыбы поедали кормолекарственную смесь за 10–15 минут.

Результаты и обсуждение

За 2 дня до обработки препаратом провели клинический осмотр осетров и подсчет аргулюсов на поверхности тела у рыб подопытных и контрольной групп. При идентификации обнаруженных на коже осетров рачков было установлено, что они относятся к виду *Argulus coregoni* (рис. 1).

Клиническая картина заболевания характеризовалась язвами, потертостями, повышенным слизеотделением на поверхности тела и была обусловлена высокой степенью заражения рыб рачками (Рис. 2). Экстенсивность инвазии аргулёзом у всех групп осетров составила 100 %. Средняя интенсивность инвазии составила: в группе № 1 – 144,7 экз., в группе № 2 – 139,9

Рис. 1. *Argulus coregoni*

Рис. 2. *Argulus coregoni* на голове и спинной части тела ленского осетра (до обработки препаратом Эмикон®).

Рис. 3. Ленский осетр через 7 дней после обработки препаратом Эмикон®.

avvb_2021_02.indd 60 26.06.2021 20:37:03

Таблица 1

Эффективность препарата Эмикон® при аргулёзе осетров

Показатели	ИИ (экз.) / ЭИ (%)		ИЭ (%)	ЭЭ (%)
Группы	До обработки	Через 7 дней после завершения курса обработки		
Подопытная группа № 1. Доза 0,025 г/кг, (n = 9)	144,7 / 100	2,3 / 66,7	98,9	33,3
Подопытная группа № 2. Доза 0,05 г/кг, (n = 12)	139,9 / 100	0 / 0	100	100
Подопытная группа № 3. Доза 0,1 г/кг, (n = 16)	168,5 / 100	0 / 0	100	100
Контрольная группа, (n = 10)	101 / 100	173,9 / 100	-	-

Примечание: ИИ – интенсивность инвазии; ЭИ – экстенсивность инвазии; ИЭ – интенсэффективность; ЭЭ – экстенсэффективность.

экз., в группе № 3 – 168,5 экз., в группе № 4 – 101,0 экз.

На 14-й день эксперимента у осетров всех подопытных групп было отмечено отсутствие кожных повреждений на поверхности тела (рис. 3). При наружном осмотре рыб установлено, что средняя интенсивность инвазии в группе № 1 составила 2,3 экз., а в группах № 2 и № 3 рачков обнаружено не было. При этом у рыб контрольной группы № 4, не получавших препарат, мы обнаружили увеличение количества паразитов до 173,9 экз., что свидетельствовало о повышении интенсивности инвазии в период опыта.

Минимальная доза 0,025 г/кг массы рыб показала высокую интенсэффективность, которая составила 98,9 %, но при этом только 33,3 % рыб были полностью свободны от рачков. Наиболее эффективными оказались дозы препарата 0,05 г/кг и 0,1 г/кг массы рыб, которые обеспечили 100 % эффективность (табл. 1).

Поскольку препарат показал максимальную эффективность в отношении аргулюсов в дозах 0,05 г/кг и 0,1 г/кг массы рыб, то оптимальной дозой можно считать наименьшую из них 0,05 г/кг рыб.

Во время применения препарата Эмикон® и через 14 дней после 7-кратного его введения в трех дозах, отклонений в физиологическом состоянии осетров, побочных явлений, осложнений, нежелательных реакций не выявлено.

Конаковский завод – индустриальное бассейновое предприятие, использующее сбросные тёплые воды Конаковской ГРЭС. Технологической особенностью водоснабжения бассейнов с ремонтно-маточным стадом осетровых рыб является поступление воды из р. Волги, что обусловливает постоянный занос возбудителей аргулёза в хозяйство. Несмотря на регулярно проводимые мероприятия по ликвидации заболевания, включающие использование хлорофоса, существенно снизить уровень заражения рачками в период их активного развития на протяжении ряда лет не удается.

Внедрение в рыбоводную практику нового препарата Эмикон®, отвечающего современным требованиям безопасности и обладающего высоким потенциалом в борьбе с крустацеозами, будет способствовать усовершенствованию мероприятий по охране здоровья осетровых рыб.

Заключение

Оптимальной для применения считаем дозу препарата Эмикон® 0,05 г/кг массы рыбы. Препарат в этой дозе показал 100 % интенсэффективность и экстенсэффективность при аргулёзе ленских осетров. Эмикон® в терапевтической и в два раза увеличенной дозе при курсовом (в течение семи дней) применении не влияет на общее состояние ленских осетров.

avvb_2021_02.indd 61 26.06.2021 20:37:03

Список литературы

1. Афанасьев В. И. Опыт борьбы с инфекционными и инвазионными болезнями рыб. / В. И. Афанасьев // Ветеринария, 1975, № 6, с. 62–64.

2. Васильева Л. М. Проблемы и перспективы развития аквакультуры осетровых рыб в современных условиях / Л. М. Васильева. // Астрахань: Аквакультура осетровых рыб: проблемы и перспективы: сборник статей Международной научно-практической конференции, 10 – 12 октября 2017. Издательский дом «Астраханский университет», 2017. С. 7–10.

3. Головин П. П. Паразиты и болезни осетровых рыб в товарных индустриальных хозяйствах / П. П. Головин, Н. А. Головина, Н. В. Гусева // Проблемы современного товарного осетроводства: Тез. докл. I науч.-практ. конф. 24–25 марта 1999 г. Астрахань, 1999. С. 121–124.

4. Головина Н. А. Аргулез осетровых рыб в аквакультуре / Н. А. Головина, О. В. Корабельникова, М. А. Коротков // Рыбное хозяйство. 2013. № 5. С. 111–114.

5. Казарникова А. В. Основные заболевания осетровых рыб в аквакультуре. / А. В. Казарникова, Е. В. Шестаковская. М.: Изд-во ВНИРО, 2005. 104 с.

6. Казарникова А. В. Сравнительный анализ паразитофауны осетровых рыб Азовского бассейна / А. В. Казарникова. Болезни рыб: сборник научных трудов. Вып. 79. М.: Компания спутник+, 2004. С. 91–99.

7. Корабельникова О. В. Паразитирование рачков рода *Argulus* на осетровых рыбах / О. В. Корабельникова // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов–2: Расширенные материалы Международной научно–практической конференции, Борок, 17–20 июля 2007 года. М.: Россельхозакадемия 2007. С. 511–514.

8. Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР. Т. 3. Паразитические многоклеточные. (Вторая часть). Л.: Наука, 1987. 583 с. (Определители по фауне СССР, изд. Зоол. ин-том АН СССР; Вып. 149).

9. Сухенко Г. Е. Хлорофос для профилактики паразитарных болезней рыб. / Г. Е. Сухенко // Ветеринария, 1975, № 6, с. 77–78.

Уважаемые коллеги!

Предлагаем вашему вниманию новый ДИСТАНЦИОННЫЙ курс «Работа с источниками ионизирующего излучения, ответственный за радиационную безопасность на предприятии, персонал группы "А"»!

!! Освоение данного курса необходимо для лицензирования рентгенкабинета !!

По окончании курса слушатели, прошедшие итоговое испытание, получают:

Удостоверение о повышении квалификации «Ответственный за радиационную безопасность на предприятии», 72 часа

Сертификат специалиста «Радиационная безопасность при работе с источниками ионизирующего излучения (персонал группы "А")»

Подробнее о курсе: **http://invetbio.spb.ru/seminar_rgB.htm**
Запись: **http://invetbio.spb.ru/seminar_registracia.htm**

avvb_2021_02.indd 62 26.06.2021 20:37:03

DOI: 10.24412/2074-5036-2021-2-63-68
УДК 614.95:637.05
Ключевые слова: микроэлементы, тяжелые металлы, мышьяк, пищевые яйца
Key words: trace elements, heavy metals, arsenic, edible eggs

Степанова М. В., Узелкова С. Ю., Онегина П. А.

СОДЕРЖАНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И МЫШЬЯКА В ПИЩЕВЫХ КУРИНЫХ ЯЙЦАХ

CONTENT OF HEAVY METALS AND ARSENIC IN EDIBLE CHICKEN'S EGGS

ФГБОУ ВО «Ярославская государственная сельскохозяйственная академия»
Адрес: 150042, Россия, Ярославль, Тутаевское шоссе, д. 58
State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Yaroslavl State Agricultural Academy»
Address: 150042, Russia, Yaroslavl, Tutaevskoe shaussee, 58

Степанова Марина Вячеславовна, к. б. н., доцент кафедры ветеринарно-санитарная экспертиза.
E-mail: Stepanova-marina@bk.ru
Stepanova Marina Vyacheslavovna, PhD of Biological Science, Associate Professor of the Department of Veterinary and Sanitary Expertise. Stepanova-marina@bk.ru
Узелкова Светлана Юрьевна, старший преподаватель кафедры ветеринарно-санитарная экспертиза.
E-mail: vip-box2004@mail.ru
Uzelkova Svetlana Yurievna, Senior Lecturer of the Department of Veterinary and Sanitary Expertise.
E-mail: vip-box2004@mail.ru
Онегина Полина Александровна, студентка. E-mail: polinaonegina2002@gmail.com
Onegina Polina Alexandrovna, Student. E-mail: polinaonegina2002@gmail.com

Аннотация. В статье представлены результаты исследований микроэлементного состава куриных пищевых яиц. Целью исследования было привести оценку качества и соответствия ветеринарно-санитарным нормам по органолептическим, физическим свойствам и химическим показателям куриных яиц различных категорий, используемых в зоологических учреждениях для кормления животных. В ходе исследования установлено, что яйца куриные пищевые 60 % яиц отборной, 70 % – первой и 40 % второй категории производства АО «Окское» соответствуют требованиям ГОСТ 31654-2012 и «Правил ветеринарно-санитарной экспертизы яиц домашней птицы» от 01.06.1981 г. 30 % образцов яиц первой, 40 % – второй и 60 % – третьей категории имели небольшие пятна помета. 10 % яиц отборной категории имели порок скорлупы – тек, у 10 % образцов второй категории обнаружена насечка. Скорлупа яиц первой категории не имела повреждений. Методом овоскопии было подтверждено соответствие сроков хранения яиц, заявленных производителем, с действительными, установленными в ходе проведения исследований. Высота воздушной камеры яиц всех исследуемых категорий не превышала 4,3 мм, что характерно для яиц, хранившихся 6–9 суток. Лучший показатель свежести был у яиц второй категории, так как высота пуги у образцов этой пробы имела наименьшее значение (2,6±0,32 мм), в то время как у первой категории – 3,3±0,16 мм, у яиц отборной категории – 3,9±0,19 мм. По физическим характеристикам исследуемые пробы яиц отвечали требованиям нормативных документов. При определении массы яиц подтвердилась их принадлежность к тем категориям, которые указаны в маркировке. По химико-токсикологическим показателям куриные яйца соответствовали требованиям СанПиН 2.3.2.1078-01 и ТР ТС 021/2011. При сравнении данных элементного состава куриных яиц установлено достоверно ($p < 0,05$) увеличение содержания всех ТМ в желтке, в сравнении с белком, в раз: Zn – в 21,0; Cu – 4,41; Fe – в 2,73; Pb – 116,7 и Cd – в 1,25 и снижение As – в 7,25.

Summary. *The article presents the results of studies of the microelement composition of chicken food eggs. The aim of the study was to assess the quality and compliance with veterinary and sanitary standards for organoleptic, physical properties and chemical indicators of chicken eggs of various categories used in zoological institutions for animal feeding. In the course of the study, it was found that food table hen eggs 60 % of the eggs are selected, 70 % – the first and 40 % of the second category produced by JSC "Okskoye" meet the requirements of GOST 31654-2012 and "Rules for veterinary and sanitary examination of poultry eggs" dated 01.06.1981 d. 30 % of the samples of eggs of the first, 40 % – of the second and 60 % – of the third category had small spots of droppings. 10 % of the eggs of the selected category had a defect of the shell – tek, in 10 % of the samples of the second category, a notch was found. The shells of the eggs of the first category were not damaged. By the method of ovoscopy, the compliance of the shelf life of the eggs declared by the manufacturer with the valid ones established during the research was confirmed. The height of the air chamber of eggs of all studied categories did not exceed 4.3 mm, which is typical for eggs stored for 6–9 days. The best indicator of freshness was in the eggs of the second category, since the height of the pug in the samples of this sample had the smallest value (2.6 ± 0.32 mm), while in the first category - 3.3 ± 0.16 mm, in the eggs selected category – 3.9 ± 0.19 mm. In terms of physical characteristics, the*

avvb_2021_02.indd 63 26.06.2021 20:37:03

test egg samples met the requirements of regulatory documents. When determining the weight of eggs, their belonging to the categories indicated in the marking was confirmed. In terms of chemical and toxicological indicators, chicken eggs met the requirements of SanPiN 2.3.2.1078-01 and TR CU 021/2011. When comparing the data on the elemental composition of chicken eggs, a significant (p <0.05) increase in the content of all HMs in the yolk, in comparison with the protein, was established by a factor of: Zn – by 21.0; Cu – 4.41; Fe – 2.73; Pb – 116.7 and Cd – 1.25 and decrease in As – 7.25.

Введение

Куриные яйца – богатый питательными веществами пищевой продукт. Сбалансированное содержание необходимых для человека белков, жиров, витаминов, макро- и микроэлементов делают яйца легкоусвояемыми для организма. Доступность и польза данной продукции стали залогом стабильного спроса на рынке [4].

Несмотря на все положительные свойства, куриные яйца могут принести вред, если перед реализацией они не прошли проверку на качество и безопасность. Выпуск доброкачественной продукции и предотвращение распространения зооантропонозов является главной задачей ветеринарно-санитарных экспертов. Качество яиц регламентируется ТР ТС 021/2011, согласно которому в пищевой продукции, находящейся в обращении, не допускается наличие возбудителей инфекционных, паразитарных заболеваний, или токсинов, представляющих опасность для здоровья человека и животных [4]. Из токсических элементов, в соответствии с ГОСТ 31654-2012 и ГОСТ 31655-2012, в яйцах птицы оценивается содержание радионуклидов, мышьяка, ртути, свинца и кадмия [3].

Цель исследований – оценка качества и соответствия ветеринарно-санитарным нормам по органолептическим, физическим свойствам и химически показателям куриных яиц различных категорий, используемых в зоологических учреждениях для кормления животных.

Материалы и методы

В период с 2019 по 2020 годы были выполнены исследования на базе Ярославской государственной сельскохозяйственной академии и лаборатории ГБУ ЯО «Ярославская областная ветеринарная лаборатория» на атомно абсорбционном спектрометре «Квант-2А». Объектами исследований послужили яйца куриные пищевые столовые отборной, первой и второй категории производства АО «Окское» (Россия, 390540, Рязанская область, Рязанский район, Окский п., стр. 6). Отбор проб куриных яиц проводили в Ивановском, Московском и Ярославском зоопарках в соответствии с требованиями ГОСТ 31654-2012. Отбор проб осуществлялся в соответствии с ГОСТ 31654-2012, пробоподготовка производилась методом сухой минерализации с добавлением азотной кислоты на электроплитке и в муфельной печи по ГОСТ 26929-94, определение Zn, Cu, Fe, Pb и Cd произведен атомно-абсорбционным методом по ГОСТ 30178-96, As – по ГОСТ Р 51766-2001. Исследования были выполнены в условиях повторяемости и промежуточной прецизионности. При расчете концентраций определяемых элементов в пробах осуществлялась метрологическая обработка результатов в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений». Оценка качества яиц производилась в соответствии с СанПиН 2.3.2.1078-01 [2]. Внешним осмотром устанавливали наличие поврежденности, загрязненности, пороков скорлупы в соответствии с требованиями ГОСТ 31654-2012, «Правил ветеринарно-санитарной экспертизы яиц домашней птицы» от 01.06.1981 г., ГОСТ Р 54486-201.

Овоскопию яиц проводили с помощью прибора контроля качества куриных яиц ПКЯ-10. При просвечивании яиц измеряли высоту воздушной камеры, используя шаблон-измеритель, в соответствии с ГОСТ 31654-2012. Определяли состояние воздушной камеры, состояние и положение желтка, отмечали наличие пороков. Данный метод оценки качества яиц даёт возможность определить их свежесть: чем старее яйца, тем значение высоты воздушной камеры больше. Содержимое яиц оценивали по следующим показателям: запах, наличие зародыша, состояние белка и желтка, на соответствие

avvb_2021_02.indd 64 26.06.2021 20:37:03

требованиям «Правил ветеринарно-санитарной экспертизы яиц домашней птицы» от 01.06.1981 г.

Из физических показателей определяли массу одного и десяти яиц взвешиванием согласно ГОСТ 24104-2001 с помощью лабораторных электронных весов ВМ-153. На основании полученных измерением данных устанавливали соответствие исследуемых яиц категории, заявленной на маркировке. Индекс формы – показатель качества яйца, определяемый отношением поперечного диаметра к продольному, выражаемый в процентах [3]. Чем выше количественная характеристика этого показателя, тем более округло яйцо, чем ниже – тем яйцо вытянутее и удлиненное [6]. Индекс формы влияет на товарные свойства яйца: нестандартные по форме яйца плохо упаковываются в бугорчатые прокладки, что может привести к повреждению целостности скорлупы, при этом возрастает риск заражения яиц патогенными микроорганизмами. Измерения размеров яиц проводили с использованием штангенциркуля с точностью до 0,1 мм и рассчитывали индекс формы [7]. Индекс желтка – показатель качества желтка, определяемый отношением высоты желтка к его диаметру [3]. Единицы Хау – показатель консистенции плотного белка. Единицы Хау определяли по готовым таблицам, на пересечении величин, соответствующих высоте плотного белка и массы данного яйца. При долгом хранении яиц показатели индекса желтка и единиц Хау снижаются, поэтому, чем они выше, тем лучше качество яиц.

Результаты измерений статистически обработаны с помощью пакета программ Microsoft Office Excel 2010, Statistica версия 10.0 в среде Windows XP.

Результаты исследований

Визуальным осмотром было установлено, что яйца всех категорий в большей и меньшей

Таблица 1

Результаты органолептических исследований сырых куриных яиц

Показатель	Результаты исследований яиц по органолептическим показателям			
	Отборные	Первая категория		Вторая категория
Состояние скорлупы	У 40 % яиц наблюдалось загрязнение скорлупы пятнами крови и помета.	У 30 % яиц небольшие пятна помета. Без механических повреждений.	У 60 % яиц скорлупа загрязнена.	
Пороки	Поврежденность скорлупы и подскорлуповой оболочки (10 %); морщинистость скорлупы (20 %); белые крапинки на скорлупе (40 %).	Морщинистость скорлупы (10 %); шероховатость скорлупы (10 %).	Насечка яйца (10 %); шероховатость скорлупы (20 %); белые крапинки на скорлупе (40 %). Выливка яйца (10 %).	
Состояние белка	Чистый, без мути, вязкий, прозрачный, с желтовато-зеленоватым оттенком.		У 30 % яиц – чистый, прозрачный, бесцветный, слегка вязкий, не выражен плотный слой.	У остальных яиц – чистый, без мути, вязкий, прозрачный, с желтовато-зеленоватым оттенком.
Состояние желтка	Чистый, вязкий, равномерно окрашенный в оранжевый цвет	Чистый, вязкий, равномерно окрашенный в желтый	Чистый, вязкий, равномерно окрашенный в желтый.	
Зародыш	Без признаков развития			
Запах	Естественный, без каких-либо посторонних запахов.			

avvb_2021_02.indd 65 26.06.2021 20:37:03

Таблица 2

Результаты овоскопии яиц

Показатель	Результаты экспертизы			Соответствие требованиям ГОСТ 31654-2012, «Правил ветеринарно-санитарной экспертизы яиц домашней птицы»
	Отборные	Первая категория	Вторая категория	
Высота воздушной камеры, мм	3,9±0,19	3,3±0,16	2,6±0,32	Соответствует
Состояние воздушной камеры	У 20 % яиц слегка перемещается	Неподвижная		Соответствует

степени были загрязнены пятнами помета и крови. Не соответствовали норме по данному показателю среди яиц отборной категории 40 %, первой категории – 30 %, второй категории – 60 %. Внешне поврежденность скорлупы выявлена у 10 % яиц второй категории, наблюдалась насечка – трещина, у 10 % яиц отборной категории была нарушена целостность не только скорлупы, но и подскорлупной оболочки. Яйца с данными пороками являются неполноценными и подлежат промышленной переработке. У яиц первой категории механических повреждений скорлупы не обнаружено (табл. 1).

Среди пороков скорлупы, допускающих яйца в свободную реализацию, внешним осмотром были обнаружены:

Морщинистость – поверхность яйца в виде складок – 20 % яиц отборной категории, 10 % яиц первой категории. Данный порок был выражен не сильно, незначительное поражение скорлупы на концах яиц.

Шероховатость – мелкий зернистый налет на концах яйца – 10 % яиц первой категории, 20 % яиц второй категории.

Белые крапинки – небольшие, похожие на кальциевые отложения, пятна – по 40 % яиц отборной и второй категорий, выраженность порока в обоих случаях небольшая.

Чтобы дать оценку качеству содержимого яйца, разбили по 10 яиц каждой исследуемой категории. Соответствие органолептических показателей требованиям «Правил ветеринарно-санитарной экспертизы яиц домашней птицы»

Таблица 3

Результаты экспертизы физиологических свойств куриных яиц

Показатель	Норма	Результаты экспертизы яиц		
		Отборные	Первая категория	Вторая категория
Масса 1 яйца, г				
отборные	65 – 74,9[1]	68,21±0,99		
1-я категория	55 – 64,9[1]		59,12±0,72	
2-я категория	45 – 54,9[1]			52,69±0,73
Масса 10 яиц, г				
Отборные	650 – 749,9[1]	682,1		
1-я категория	550 – 649,9[1]		591,2	
2-я категория	450 – 549,9[1]			526,9
Индекс формы, %	70 – 78[2]	74,98±0,88	78,02±1,17	77,86±0,97
Индекс желтка, %	40 – 50[2]	41,87±1,70	44,82±1,00	43,71±1,93
Единицы Хау	65 – 87[2]	64,4±3,53	77,2±1,90	80,87±0,64*

Примечание: [1] – Требования ГОСТ 31654-2012. [2] – В соответствии с данными [1]. * – Расчёт с учётом выбраковки 30% яиц.

avvb_2021_02.indd 66 26.06.2021 20:37:03

установлено у яиц отборной и первой категории. Из второй категории 30 % яиц не соответствовали норме по состоянию белка, который был жидким, плотный белок не был выражен.

Результаты овоскопии (табл. 2) показали, что наиболее свежими оказались яйца второй категории, на это указывает наименьшее значение высоты воздушной камеры (2,6±0,32 мм). Срок хранения яиц на день проведения овоскопирования составлял у отборной и первой категории 9 дней, у второй категории – 6 дней. По данным Е.А. Бурмистрова, высота воздушной камеры яиц, хранившихся 6–9 дней, не должна превышать 4,3 мм [1]. Исследуемые яйца соответствовали данной норме, это говорит о том, что указанные на упаковке характеристики яйца о сроках хранения подтвердились.

Результаты физиологических исследований представлены в таблице 3. Значения исследуемых физических характеристик яиц каждой категории находятся в пределах нормы. Наименьший показатель индекса формы у яиц отборной категории (74,98±0,88) характеризует форму, как более вытянутую, по сравнению с другими категориями, у которых значение данного показателя практически на одном уровне. Более низкие значения индекса желтка и единиц Хау имеют отборные яйца, что связано с их длительным сроком хранения.

По данным, представленным на рисунках 2 и 3, видно, что масса исследуемых яиц соответствовала нормативным значениям массы первой и второй категории, заявленных производителем. Из яиц отборной категории 20 % относились к первой категории (рис. 1). Так как средняя масса и масса десяти яиц соответствуют норме для заявленной категории, то нарушением это нельзя считать.

Результаты химико-токсикологических исследований проб яйца куриного методом атомно-абсорбционной масс-спектро-

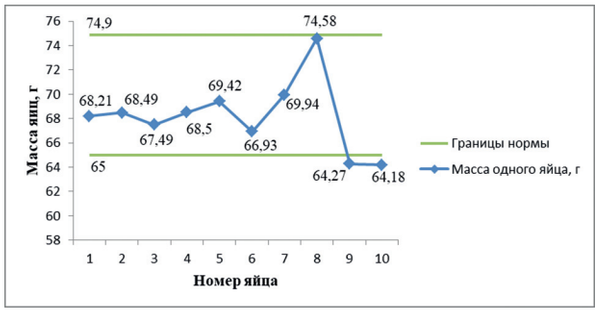

Рис.1. График соответствия массы исследуемых куриных яиц отборной категории требованиям ГОСТ 31654-2012.

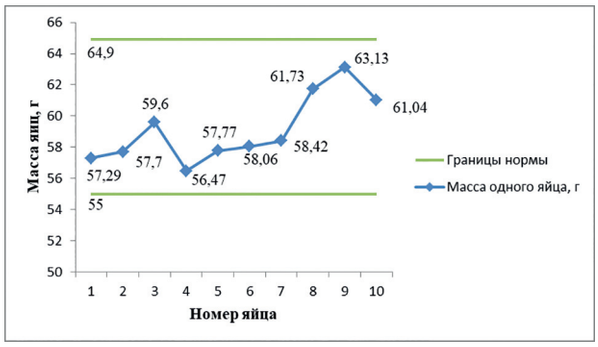

Рис.2. График соответствия массы исследуемых куриных яиц первой категории требованиям ГОСТ 31654-2012.

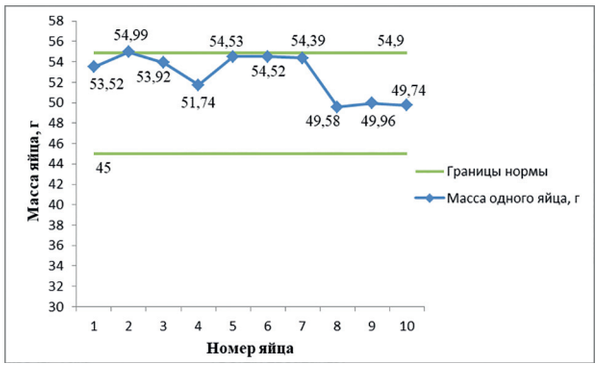

Рис.3. График соответствия массы исследуемых куриных яиц второй категории требованиям ГОСТ 31654-2012.

Таблица 5

Результаты исследования проб куриных яиц на наличие тяжелых металлов, мг/кг

Наименование	МЭ и ТТМ					
	Цинк	Медь	Железо	Свинец	Кадмий	Мышьяк
Белок	0,34±0,42	0,17±0,27	2,87±1,79	0,0018±0,0003	0,0008±0,0001	0,0145±0,0017
Желток	7,14±3,84	0,75±0,11	7,84±3,48	0,21±0,09	0,001±0,000	0,002±0,001
Допустимый уровень	50,0	3,0	-	0,3	0,01	0,1

avvb_2021_02.indd 67 26.06.2021 20:37:03

метрии представлены в таблице 5. Содержание тяжелых металлов находится в пределах нормы.

Анализируя содержание микроэлементов в белке и желтке куриных яиц, используемых в рационах зоологических учреждений для кормления животных, выявили, что их концентрация, за исключением железа, подвержена незначительным колебаниям и находится в оптимальных соотношениях по сравнению с показателями, полученными при исследовании яиц. При сравнении данных элементного состава куриных яиц установлено достоверно ($p < 0,05$) увеличение содержания всех ТМ в желтке, в сравнении с белком, в раз: Zn – в 21,0; Cu – 4,41; Fe – в 2,73; Pb – 116,7 и Cd – в 1,25 и снижение As – в 7,25.

Заключение

В ходе исследования установлено, что яйца куриные пищевые 60 % яиц отборной, 70 % первой и 40 % второй категории производства АО «Окское» соответствуют требованиям ГОСТ 31654-2012 и «Правил ветеринарно-санитарной экспертизы яиц домашней птицы» от 01.06.1981 г. 30 % образцов яиц первой, 40 % второй и 60 % третьей категории имели небольшие пятна помета. 10 % яиц отборной категории имели порок скорлупы – тек, у 10 % образцов второй категории обнаружена насечка. Скорлупа яиц первой категории не имела повреждений. Методом овоскопии было подтверждено соответствие сроков хранения яиц, заявленных производителем, с действительными, установленными в ходе проведения исследований. Высота воздушной камеры яиц всех исследуемых категорий не превышала 4,3 мм, что характерно для яиц, хранившихся 6–9 суток. Лучший показатель свежести был у яиц второй категории, так как высота пуги у образцов этой пробы имела наименьшее значение (2,6±0,32 мм), в то время как у первой категории – 3,3±0,16 мм, у яиц отборной категории – 3,9±0,19 мм. По физическим характеристикам исследуемые пробы яиц отвечали требованиям нормативных документов. При определении массы яиц подтвердилась их принадлежность к тем категориям, которые указаны в маркировке. По химико-токсикологическим показателям куриные яйца соответствовали требованиям СанПиН 2.3.2.1078-01 и ТР ТС 021/2011. При сравнении данных элементного состава куриных яиц установлено достоверно ($p < 0,05$) увеличение содержания всех ТМ в желтке, в сравнении с белком, в раз: Zn – в 21,0; Cu – 4,41; Fe – в 2,73; Pb – 116,7 и Cd – в 1,25 и снижение As – в 7,25.

Список литературы

1. Горелик, Л. Ш. Анализ взаимосвязей между морфологическими показателями пищевых яиц / Л. Ш. Горелик, М. А. Дерхо, С. Ю. Харлапс, О. В. Горелик, О. Г. Лоретц // Аграрный вестник Урала. 2018. № 8 (175). С. 24–29. URL: https://www.elibrary.ru/item.asp?id=35310742 (дата обращения: 09.03.2021).

2. ГОСТ 31654-2012. Яйца куриные пищевые. Технические условия = Food chicken eggs. Specifications: межгосударственный стандарт: издание официальное: принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол N 50 от 20 июля 2012 г.): введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28 сентября 2012 г. N 441-ст : введен впервые : дата введения 2014-01-01 / подготовлен ГНУ «ВНИТИП», НО «Росптицесоюз» Текст: электронный. – URL: http://docs.cntd.ru/document/1200095479 (дата обращения: 07.03.2021).

3. ГОСТ Р 54486-2011. Яйца пищевые. Термины и определения = Food eggs. Terms and definitions: национальный стандарт Российской Федерации: издание официальное : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 7 ноября 2011 г. N 518-ст : введен впервые : дата введения 2012.07.01 / разработан ГНУ «ВНИТИП» Россельхозакадемии. – Текст: электронный. – URL: http://docs.cntd.ru/document/1200093468 (дата обращения: 07.03.2021).

4. Клетикова Л. В. Диапазон содержания тяжелых металлов в яйцах сельскохозяйственной птицы / Л. В. Клетикова, В. Ю. Лобков, В. В. Пронин // Птицеводство. 2019. № 2. С. 46–49.

5. Правила ветеринарно-санитарной экспертизы яиц домашней птицы : официальное издание : утверждены Главным управлением ветеринарии МСХ СССР и согласованы с Министерством здравоохранения СССР 1 июня 1981 г.: введены в действие 01.06.1981. – Текст: электронный. URL: https://fsvps.gov.ru/fsvps/laws/4756.html (дата обращения: 07.03.2021).

6. Товарные свойства и качество пищевых куриных яиц / О. М. Бурмистрова, Е. А. Бурмистров, Н. Л. Наумова. Текст : электронный // Аграрный вестник Урала. 2019. № 9 (188). С. 19–29. – URL: https://www.elibrary.ru/item.asp?id=41219213 (дата обращения: 07.03.2021).

7. Царенко, П. П. Методы оценки и повышения качества яиц сельскохозяйственной птицы: учебное пособие / П. П. Царенко, Л. Т. Васильева. Санкт-Петербург: Лань, 2016. 280 с. URL: https://e.lanbook.com/book/87597 (дата обращения: 07.03.2021).

avvb_2021_02.indd 68 26.06.2021 20:37:04

DOI: 10.24412/2074-5036-2021-2-69-74
УДК 619:616-091:636.4
Ключевые слова: свиньи, патоморфологические изменения, препараты железа
Key words: pigs, pathomorphological changes, iron preparations

[1]Кудряшов А. А., [1]Балабанова В. И., [2]Ктитаров Д. С., [3]Ефремов С. Л., [3]Овченков И. А.

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МЕСТЕ ИНЪЕКЦИИ ПРЕПАРАТА ЖЕЛЕЗА У СВИНЕЙ

PATHOMORPHOLOGICAL CHANGES AT THE INJECTION SITE OF THE IRON PREPARATION IN PIGS

[1]ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»
Адрес: 196084, Россия, Санкт–Петербург, Черниговская ул., 5
St. Petersburg State University of Veterinary Medicine
Address: 196084, Russia, Saint–Petersburg, Chernigovskaya Str., 5
[2]АО Племзавод «Заволжское» Тверской области
Адрес: 170508, Тверская область, Калининский район, поселок Заволжский, дом 1в
JSC Zavolzhskoye Breeding Plant, Tver Region
Address:170508, Tver Region, Kalininsky District, Zavolzsky, 1в
3ООО «Бёрингер Ингельхайм»
Адрес: 125171, Москва, Ленинградское шоссе, 16А, стр. 3
3Boehringer Ingelheim LTD
Address: 125171, Moscow, Leningradskoe Shaussee, 16A, bild.3

Кудряшов Анатолий Алексеевич, д. в. н., проф., зав. кафедрой патологической анатомии и судебной ветеринарной медицины
Kudriashov Anatoly Alekseevich, Doctor of Veterinary Science, Professor, Head of the Pathologic Anatomy Depart
Балабанова Виктория Игоревна, к. в. н., доцент кафедры патологической анатомии и судебной ветеринарной медицины
Balabanova Victoria Igorevna, PhD of Veterinary Science, Associate Professor of the Pathologic Anatomy Depart.
E-mail: patan2017@outlook.com
Ктитаров Денис Сергеевич, главный ветеринарный врач
Ktitarov Denis Sergeevich, Chief Veterinarian. E-mail: Dengtn@gmail.com
Ефремов Сергей Леонидович, ветеринарный врач
Efremov Sergey Leonidovich, Veterinarian
Овченков Иван Александрович, ветеринарный врач. E-mail: ivan.ovchenkov@boehringer-ingelheim.com
Ovchenkov Ivan Aleksandrovich, Veterinarian. E-mail: ivan.ovchenkov@boehringer-ingelheim.com

Аннотация. В 2020–2021 годах при послеубойном осмотре свиней из крупного свиноводческого предприятия в 20 % туш, в мягких тканях заушной области обнаружили участки с ржаво-жёлто-коричневым окрашиванием. С учётом убытков в виде ухудшения товарности мяса и репутационных рисков, было решено выяснить причину появления этого дефекта туш. Анализируя ситуацию, авторы статьи отметили вероятную связь между пигментацией и инъекциями железосодержащего препарата и задались целью изучить морфологию тканей в месте пигментации для объяснения морфогенеза наблюдаемого явления. Объектом исследования явились 2 туши убойных свиней в возрасте 6,5 месяцев, имевших жёлто-коричневое окрашивание тканей в области шеи. Свиньям в первую неделю жизни был внутримышечно инъецирован ферродекстрановый препарат в заушной области в рекомендованной дозе. Материалом для гистологического исследования послужили пробы мышц и межмышечной соединительной ткани из участков с пигментацией. В гистологических препаратах при среднем увеличении обнаружили воспалительные разрастания в виде фиброзной ткани из фиброцитов, фибробластов, макрофагов и массивных переплетений волокон с замурованными частицами пигментного вещества – железосодержащего препарата, введённого не менее 6 месяцев назад. При большом увеличении обнаружено множество округлых инородных частиц с золотистым контуром диаметром от 1–2 до 100 микрометров. Инородные частицы окружены соединительнотканными разрастаниями, включающими макрофаги и многоядерные гигантские клетки инородных тел, что указывает на пролиферативное (гранулематозное) воспаление. Будет логичным считать, что из-за больших размеров инородных частиц пигментированного препарата и, возможно, из-за других особенностей его физико-химических свойств организмы свиней были не в состоянии полностью утилизировать введённый препарат, что и привело к дефекту туш.

avvb_2021_02.indd 69 26.06.2021 20:37:04

Summary. *In 2020–2021, during the post-slaughter inspection of pigs from a large pig breeding enterprise in 20 % of pork carcasses, areas with rust-yellow-brown staining were found in the soft tissues of the cervical region. Taking into account the losses in the form of deterioration of the marketability of meat and reputational risks, it was decided to find out the reason for the appearance of this carcass defect. Analyzing the situation, the authors of the article noted a possible connection between pigmentation and injections of iron-containing drug and set out to study the morphology of tissues at the site of pigmentation to explain the morphogenesis of the observed phenomenon. The object of the study was 2 carcasses of slaughtered pigs at the age of 6.5 months, which had a yellow-brown staining of the tissues in the neck area. In the first week of life, the pigs were intramuscularly injected with a ferrodextran drug in Regio retroauricularis (lat.) at the recommended dose. The material for histological study was samples of muscles and intermuscular connective tissue from areas with pigmentation. In histological preparations of altered tissues, at an average magnification, inflammatory growths were found in the form of fibrous tissue from fibrocytes, fibroblasts, macrophages and massive interweaving of fibers with immured particles of a pigment substance – an iron-containing drug administered at least 6 months ago. At high magnification, a large number of rounded foreign particles with a golden contour with a diameter of 1–2 to 100 micrometers were detected. Foreign particles are surrounded by connective tissue growths, including macrophages and multinucleated giant cells of foreign bodies, which indicate proliferative (granulomatous) inflammation. It would be logical to assume that due to the large size of foreign particles of the pigmented drug and, possibly, due to other features of its physic-chemical properties, the pig organisms were not able to completely dispose of the injected drug, which led to the defect of the carcasses.*

Введение

Введение препаратов железа новорождённым поросятам в качестве профилактики железодефицитной анемии является непременным компонентом ветеринарных обработок в промышленном свиноводстве [1]. Как сообщают в своей работе А. С. Гасанов, Д. Р. Амиров, Д. М. Мухутдинова и соавторы [2]: «Высокая потребность поросят-сосунов в железе (27 мг на 1 кг прироста живой массы) удовлетворяется материнским молоком только на 10–15 %. Между тем даже при нормальных условиях содержания и кормления супоросных свиноматок запасы железа в организме новорожденных поросят не превышают 50 мг. Такой незначительный резерв быстро расходуется, и в организме поросят нарастает дефицит железа, обусловливая возникновение малокровия. Развитию малокровия у поросят благоприятствует и низкое содержание белка в кормах. При недостаточном уровне белка в сыворотке крови нарушается ассимиляция железа и внедрение его в молекулу гемоглобина. Кроме того, наблюдается резкое понижение гамма-глобулиновой фракции в сыворотке крови поросят, страдающих анемией».

В 1980-е годы, в качестве замены ранее использованных для профилактики анемии солей железа, были синтезированы ферродекстрановые препараты, в которых трехвалентное железо находится в коллоидном состоянии в соединении с углеводами. Преимущество ферродекстрановых препаратов заключается в том, что одна внутримышечная инъекция препарата в дозе 2–3 мл, как правило, предупреждает развитие анемии [3]. Ранее в свиноводстве было принято вводить препараты железа путём инъекции в бедро. Во избежание возможной порчи окорока в силу окрашивания мышц препаратами в месте введения, препараты стали вводить в мышцы верхней части шеи.

В 2020–2021 годах при послеубойном осмотре свиней из крупного свиноводческого предприятия ветеринарные специалисты в 20 % туш, в мягких тканях заушной области обнаружили участки с ржаво-жёлто-коричневым окрашиванием. С учётом убытков в виде ухудшения товарности мяса и репутационных рисков, было решено выяснить причину появления дефектов туш. Анализируя ситуацию, авторы статьи отметили вероятную связь между пигментацией и инъекциями железосодержащего препарата и задались целью изучить морфологию тканей в месте пигментации для объяснения морфогенеза наблюдаемого явления.

Материалы и методы

Объектом исследования явились 2 туши убойных свиней в возрасте 6,5 месяцев, имевших жёлто-коричневое окрашивание тканей в области шеи. Свиньям в первую неделю жизни был внутримышечно инъецирован ферродекстрановый препарат в заушной области в рекомендованной дозе. Материалом для исследования послужили пробы мышц и межмышечной соединительной ткани из участков с пигментацией в заушной области

avvb_2021_02.indd 70 26.06.2021 20:37:04

(*Regio retroauricularis*, лат.). Для приготовления гистологических срезов патологический материал фиксировали в 10 %-ном растворе нейтрального формалина. Затем проводили заливку в парафин по общепринятой методике [4]. Далее на ротационном микротоме изготовили срезы толщиной 5–7 мкм, срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Изучение гистологических препаратов проводили при помощи светооптического микроскопа для биологических исследований N-100B при увеличении 100 и 400. Микрофотографирование проводили при помощи цифровой камеры Levenhuk C510.

Результаты исследования

Результаты макроскопического исследования

При послеубойном осмотре в заушной области туш обнаружили участки межмышечной соединительной ткани, окрашенные в жёлтый цвет с коричневым оттенком (рисунки 1, 2). При пальпации в ткани этих участков ощущались небольшие плотные образования. Для гистологического исследования иссекли образцы патологического материала и зафиксировали их в 10 %-ном растворе нейтрального формалина. Провели осмотр и фотографирование зафиксированных образцов (рисунки 3, 4). На рисунках отчётливо различимы волокнистые разрастания в виде тяжей в межмышечной клетчатке, которые главным образом и содержат золотисто-жёлтый пигмент (рисунки 3, 4).

Результаты гистологического исследования

В гистологических препаратах при среднем увеличении вместо правильно расположенных, параллельно идущих соединительнотканных волокон и прослоек жировой

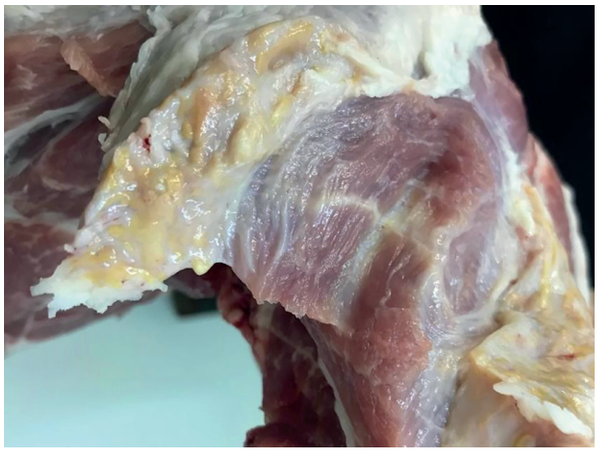

Рис. 1. Первая свинья, 6,5 мес. Окрашивание места введения препарата железа.

Рис. 2. Вторая свинья, 6,5 мес. Окрашивание места введения препарата железа.

Рис. 3. Первая свинья, 6,5 мес. Фиксированный образец тканей в месте введения препарата железа.

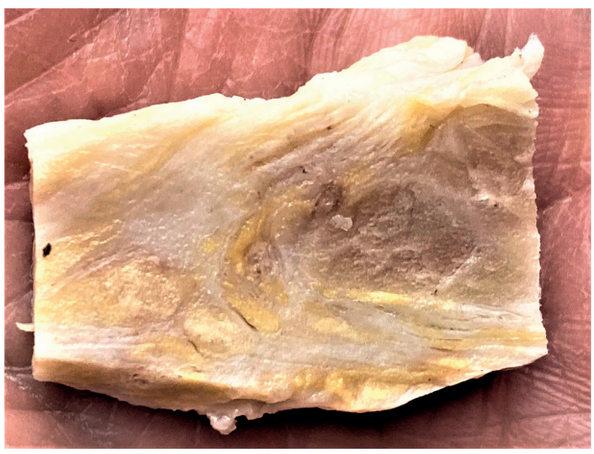

Рис. 4. Вторая свинья, 6,5 мес. Фиксированный образец тканей в месте введения препарата железа.

avvb_2021_02.indd 71 26.06.2021 20:37:04

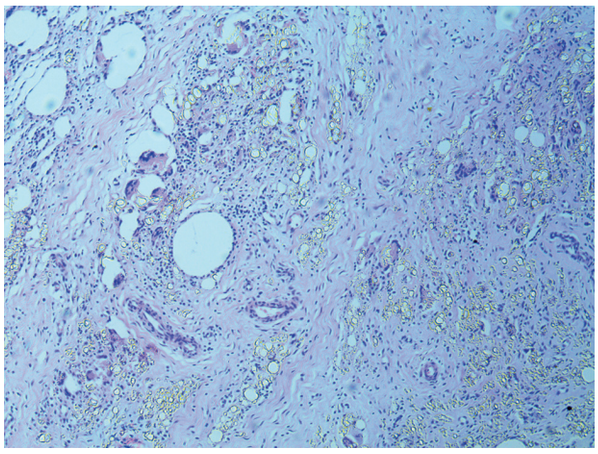

Рис. 5. Первая свинья, 6,5 мес. Гистосрез ткани в месте введения препарата железа. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 100.

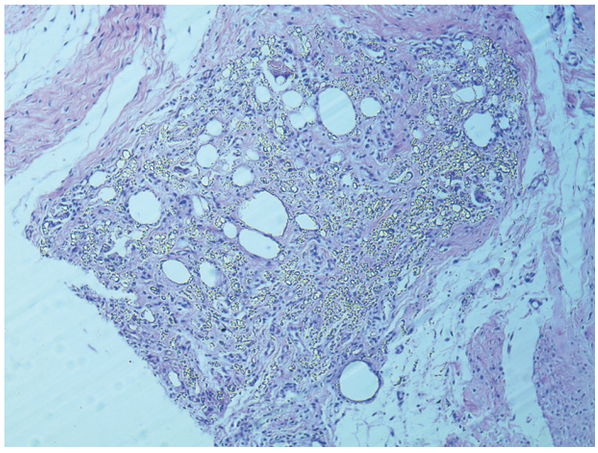

Рис. 6. Вторая свинья, 6,5 мес. Гистосрез ткани в месте введения препарата железа. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 100.

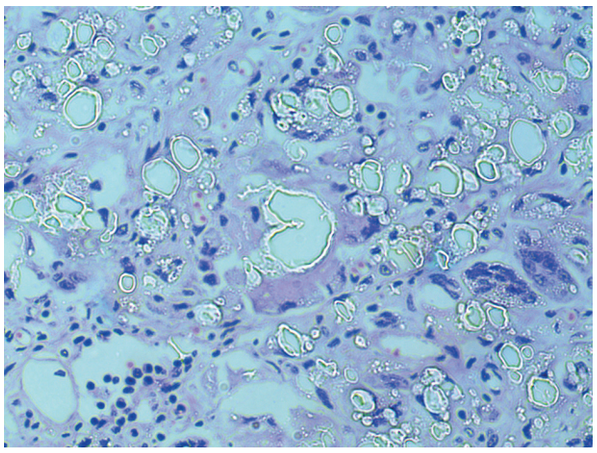

Рис. 7. Первая свинья, 6,5 мес. Гистосрез ткани в месте введения препарата железа. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 400.

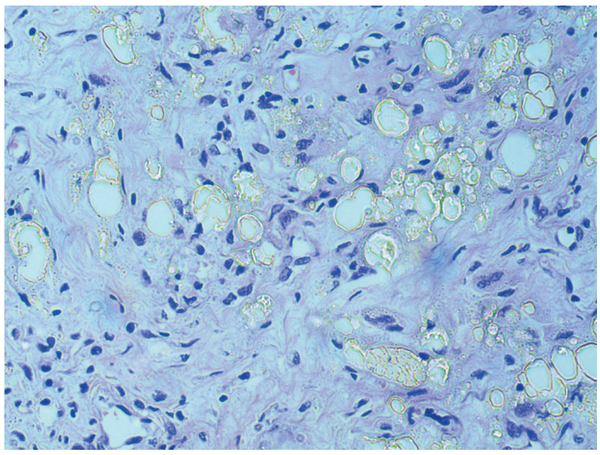

Рис. 8. Вторая свинья, 6,5 мес. Гистосрез ткани в месте введения препарата железа. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 400.

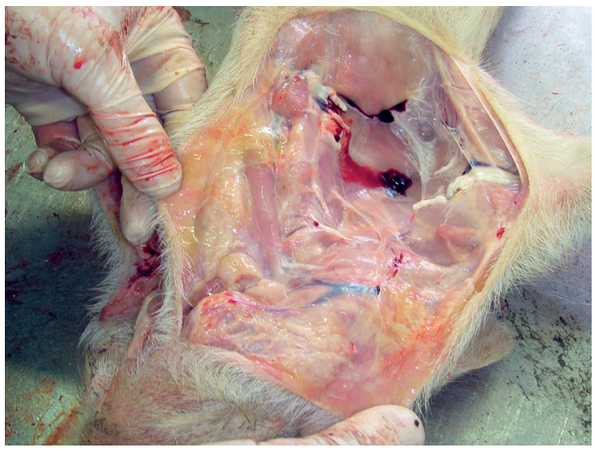

Рис. 9. Поросёнок, 2 мес. Окрашивание места введения препарата железа.

Рис. 10. Поросёнок, 2,5 мес. Окрашивание места введения препарата железа.

avvb_2021_02.indd 72 26.06.2021 20:37:04

ткани, свойственных обычной межмышечной клетчатке обнаружили воспалительные разрастания в виде фиброзной ткани из фиброцитов, фибробластов, макрофагов и массивных переплетений волокон с замурованными частицами пигментного вещества (рисунки 5, 6). При большом увеличении (рисунки 7, 8) видно множество округлых инородных частиц с золотистым контуром диаметром от 1–2 до 100 микрометров (определили примерно, сравнивая с эритроцитами, имеющими у свиней диаметр в 5–6 микрометров) – частиц железосодержащего препарата, введённого не менее 6 месяцев назад. Инородные частицы окружены соединительнотканными разрастаниями, включающими макрофаги и многоядерные гигантские клетки инородных тел, что указывает на пролиферативное (гранулематозное) воспаление. В цитоплазме гигантских клеток находятся мелкие золотистые частицы (рисунок 7) – то есть, макрофаги «пытаются» утилизировать пигмент.

Обсуждение результатов

При периодическом проведении диагностического вскрытия свиней разного возраста мы постоянно наблюдали наличие жёлто-коричневого, ржавого окрашивания в мягких тканях в местах введения железосодержащих препаратов, однако, наблюдали это у поросят-сосунов или поросят групп доращивания в возрасте до 3-х месяцев (рисунки 9, 10). В описываемой ситуации подобные изменения обнаружены у убойных свиней, когда после введения железосодержащих препаратов прошло не менее 6 месяцев. Следовательно, по какой-то причине препарат не был полностью утилизирован и остался на месте введения, к тому же у 20 % животных. Результаты исследования показывают, что жёлто-коричневое окрашивание вызвано наличием частиц железосодержащего препарата. На месте введения препарата вокруг частиц пигмента развилось хроническое гранулематозное воспаление, что подтверждается наличием в очагах воспаления многоядерных гигантских клеток инородных тел. В гранулёмах – множество частиц пигмента диаметром от 1–2 до 100 микрометров. Исходя из сравнения размеров макрофагов, в том числе и гигантских клеток, и величины многих частиц пигмента, будет логичным считать, что из-за больших размеров инородных частиц пигмента, и, возможно, из-за других физико-химических особенностей введённого препарата организмы свиней были не в состоянии полностью утилизировать введённый препарат. Авторы не нашли оснований предположить какие-либо другие причины описываемых изменений.

Выводы

1. При послеубойном осмотре свиней из крупного свиноводческого предприятия в мягких тканях заушной области в 20 % туш обнаружили участки с жёлто-коричневым окрашиванием.

2. В гистологических препаратах изменённых тканей от 2-х свиней при среднем увеличении микроскопа обнаружили воспалительные разрастания в виде фиброзной ткани из фиброцитов, фибробластов, макрофагов и массивных переплетений волокон с замурованными частицами пигментного вещества – железосодержащего препарата, введённого не менее 6 месяцев назад.

3. При большом увеличении микроскопа обнаружено множество округлых инородных частиц с золотистым контуром диаметром от 1–2 до 100 микрометров. Инородные частицы окружены соединительнотканными разрастаниями, включающими макрофаги и многоядерные гигантские клетки инородных тел, что указывает на пролиферативное (гранулематозное) воспаление.

4. Будет логичным считать, что из-за больших размеров инородных частиц пигментированного препарата и, возможно, из-за других особенностей его физико-химических свойств организмы свиней были не в состоянии полностью утилизировать введённый препарат, что и привело к дефекту туш.

Литература

1. Ветеринарные обработки свиней, проводимые в свиноводческих комплексах с замкнутым циклом производства. Нормы времени на выполнение ветеринарных работ на животноводческих фермах, комплексах и птицефабриках (одобрены Минсельхозом

avvb_2021_02.indd 73 26.06.2021 20:37:05

РСФСР, протокол от 09.12.1982 № 7) https://sudact.ru/law/normy-vremeni-na-vypolnenie-veterinarnykh-rabot-na/ Активный доступ 26.03.2021

2. Гасанов А. С. Анемия и препараты, применяемые при ее лечении и профилактике / А. С. Гасанов, Д. Р. Амиров, Д. М. Мухутдинова, А. П. Овсянников, З. Г. Чурина, Н. В. Шамсутдинова // Казань: Центр информационных технологий КГАВМ, 2020. 58 с.

3. Гуревичев П. А. Железодекстрановые препараты в ветеринарии. / П. А. Гуревичев, А. А. Дельцов, Д. Н. Уразаев // http://zoovet.info/vet-knigi/123-farmakologiya/veterinarnaya-farm/6808-zhelezodekstranovye-preparaty-v-terinarii Активный доступ 26.03.2021

4. Меркулов Г. А. Курс патогистологической техники. / Г. А. Меркулов. Л.: Медицина, 1969. 423 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 2021 г. согласно инф. письму б/н от 03.09.18 г. НДС не облагается. Адрес подписки: ...»

Стоимость редакционной подписки на 2021 год:
2400 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

avvb_2021_02.indd 74 26.06.2021 20:37:05