Актуальные вопросы ветеринарной биологии № 3 (51) сентябрь 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, доктор философии
Концевая С. Ю.,
проф., докт. вет. наук
Кудряшов А. А.,
проф., докт. вет. наук
Кузьмин В. А.,
проф., докт. вет. наук
Лайшев К.А.
проф., докт. вет. наук, акад. РАН
Макаров В.В.
проф., докт. биол. 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

ЭПИЗООТОЛОГИЯ

Савкина Е.С., Полещук Е.М., Сидоров Г.Н.
Бешенство и его распространители в Омской области в начале XXI века 3

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Березина Д.И., Фомина Л.Л.
Изменение концентрации катехоламинов в крови в условиях экпериментальной модели стресса как биомаркер у тиляпий *Oreochromis Niloticus* 9

ИММУНОЛОГИЯ

Григорьев А. Г., Ездакова И. Ю., Капустина О. В., Белоусова Р. В.
Субпопуляционная характеристика лимфоцитов крови овец при экспериментальном заражении вирусом лейкоза крупного рогатого скота 14

ВИРУСОЛОГИЯ

Доронин М. И., Михалишин Д. В., Мудрак Н. С., Борисов А. В., Груздев К. Н.
Опосредованное определение концентрации рибонуклеопротеина вируса бешенства в сырье для вакцин методом амплификации и гибридизационно-флуоресцентной детекции ампликонов 19

ПАРАЗИТОЛОГИЯ

Бондаренко Г. А., Соловьева И. А., Трухина Т. И., Иванов Д. А.
Паразитоценозы крупного рогатого скота Амурской области 28

Логинова О. А., Белова Л. М., Чупрак Д. И.
Эндопаразитарный профиль Алтайских горных баранов (*Ovis Ammon Ammon*) и Сибирских горных козлов (*Capra Sibirica*) хребта Чихачева (Кош-Агачский район, республика Алтай) 31

ДИАГНОСТИКА

Бабкина Т. Н., Ушакова Т. М.
Корреляция расстройств редокс-гомеостаза и уровня метаболических процессов при гипотиреозе у собак 37

Доронин М. И., Михалишин Д. В., Борисов А. В., Груздев К. Н.
Способ опосредованного определения количества инфекционных доз вируса бешенства в неинактивированном сырье для вакцины методом ПЦР в реальном времени 41

Чуваев И. В., Будник Ж. С.
Норма слуха у клинически здоровых кошек 49

ФАРМАКОЛОГИЯ

Шульга И. С., Остякова М. Е., Лаврушина Л. А., Горбачёва И. Е., Адамова О. Г.
Профилактическая эффективность препарата на основе *B. Thuringiensis* против восковой моли 52

ВЕТЕРИНАРНАЯ ХИРУРГИЯ

Смирнов И.А., Гаранин Д.В., Голуб Л.В., Борисовская И.М.
Опыт применения реверсивного лоскута на артерии сафена у 11 собак 57

ВЕТСАНЭКСПЕРТИЗА

Лайшев К.А., Южаков А.А., Мухачев А.Д.
Влияние различных факторов на химический состав и калорийность мяса домашних северных оленей 62

Издательство Института Ветеринарной Биологии
Адрес редакции/издателя: 197198, С.-Петербург, ул. Ораниенбаумская, д. 3-Б. Тел. (812) 232-55-92, тел./факс 232-88-61. E-mail: virclin@mail.ru. Сайт: www.invetbio.spb.ru
Подписано в печать 03.09.2021. Дата выхода: 09.09.2021. 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 № 3 (51) September 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
Laishev K.A.
Dr. Vet. Sci., Professor,
Member of RAS
Makarov V.V.
Dr. Biol. 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

EPIZOOTOLOGY

Savkina E.S., Poleshchuk E.M., Sidorov G.N.
Rabies and it's didtributors in Omsk region at the beginning of the 21st century 3

BIOLOGICAL CHEMISTRY

Berezina D.I., Fomina L.L.
Changes in the concentration of catecholamines in the blood in a condition of an experimental model of stress as a biomarker in tilapia *Oreochromis Niloticus* 9

IMMUNOLOGY

Grigoriev A.G., Ezdakova I.Yu., Kapustina O.V., Belousova R.V.
Subpopulation characteristics of sheep blood lymphocytes in experimental infection with bovine leukemia virus..... 14

VIRUSOLOGY

Doronin M.I., Michalishin D.V., Mudrak N.S., Borisov A.V., Gruzdev K.N.
Mediated determination of the ribonucleoprotein concentration of the rabies virus in raw materials for vaccines by amplification and hybridization-fluorescent detection of amplicons 19

PARASITOLOGY

Bondarenko G.I., Solovyeva I.A., Trukhina T.I., Ivanov D.A.
Parasitocenoses of cattle of the Amur regoin..... 28

Loginova O.A., Belova L.M., Chuprak D.I.
Endoparasitic profile of Altai argali (*Ovis Ammon Ammon*) and Siberian ibex (*Capra Sibirica*) of the Chikhachev mountain range (Kosh-Agach district, Altai republic)..... 31

DIAGTOSTICS

Babkina T.N., Ushakova T.M.
Correlation of redox homeostasis disorders and metabolic processes in hypothyrosis in dogs 37

Doronin M.I., Mikhalishin D.V., Borisov A.V., Gruzdev K.N.
Method for mediated determination of the amount of infectious doses of rabies virus in non-inactivated raw materials for vaccine by PCR method 41

Chuvaev I.V., Budnik Zh.S.
Hearing norm in clinically healthy cats 49

PHARMACOLOGY

Shulga I.S., Ostyakova M.E., Lavrushina L.A., Gorbacheva I.E., Adamova O.G.
Preventive efficiency of *B. Thuringiensis* based drug against bee moth 52

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 SURGERY

Smirnov I.A., Garanin D.V., Golub L.V., Borisovskaya I.M.
Experience of using a reversible flap on the saphen artery in 11 dogs 57

VETERINARY AND SANITARY EXAMINATION

Laishev K.A., Yuzhakov A.A., Mukhachev A.D.
The influence of various factors on the chemicals composition and caloric content of domestic reindeer meat 62

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 03.09.2021. Issue date: 09.09.2021. 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 10.24412/2074-5036-2021-3-3-8
УДК 619:616-022.1-033
Ключевые слова: бешенство, Омск, эпизоотология, распространители, енотовидная собака
Key words: rabies, Omsk, epizootology, distributors, raccoon dog

[1,2]Савкина Е.С., [1]Полещук Е.М., [1,3]Сидоров Г.Н.

БЕШЕНСТВО И ЕГО РАСПРОСТРАНИТЕЛИ В ОМСКОЙ ОБЛАСТИ В НАЧАЛЕ XXI ВЕКА

RABIES AND IT'S DIDTRIBUTORS IN OMSK REGION AT THE BEGINNING OF THE 21ST CENTURY

[1]ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора». Адрес: 644080, Россия, г. Омск, пр-т. Мира, д. 7
Omsk Research Institute of Natural Focal Infections.
Adress: 644080, Russian Federation, Omsk, Prospekt Mira, 7
[2]ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации». Адрес: 644099, Россия, г. Омск, ул. Ленина, д. 12
Omsk State Medical University of the Ministry of Public Health of the Russian Federation.
Adress: 644099, Russian Federation, Omsk, Lenin st., 12
[3]ФГБОУ ВО «Омский государственный педагогический университет Министерства просвещения Российской Федерации». Адрес: 644099, Россия, г. Омск, набережная им. Тухачевского, д. 14
Omsk State Pedagogical University.
Adress: 644099, Russian Federation, Omsk, Naberezhnaya Tukhachevskogo, 14

Савкина Екатерина Сергеевна – младший научный сотрудник лаборатории экологии и эпидемиологии бешенства ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации». E-mail: ayachcho@mail.ru
Savkina Ekaterina Sergeevna – Junior Researcher, Laboratory of Ecology and Epidemiology of Rabies, Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Assistant at the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Omsk State Medical University of the Ministry of Public Health of the Russian Federation. E-mail: ayachcho@mail.ru
Полещук Елена Михайловна – кандидат биологических наук, заведующая лабораторией, ведущий научный сотрудник лаборатории экологии и эпидемиологии бешенства ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора. E-mail: e-poleschuk@yandex.ru
Poleshchuk Elena Mikhailovna – PhD of Biological Sciences, Head of the Laboratory, Leading Researcher of the Laboratory of Ecology and Epidemiology of Rabies, Omsk Research Institute of Natural Focal Infections. E-mail: e-poleschuk@yandex.ru
Сидоров Геннадий Николаевич – доктор биологических наук, профессор кафедры биологии и биологического образования ФГБОУ ВО «Омский государственный педагогический университет Министерства просвещения Российской Федерации», главный научный сотрудник лаборатории экологии и эпидемиологии бешенства ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора. E-mail: g.n.sidorov@mail.ru
Sidorov Gennady Nikolaevich – Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Biology and Biological Education, Omsk State Pedagogical University, Chief Researcher, Laboratory of Ecology and Epidemiology of Rabies, Omsk Research Institute of Natural Focal Infections. E-mail: g.n.sidorov@mail.ru

Аннотация. Проведён анализ активности эпизоотического и эпидемического процессов бешенства на территории Омской области в 2004 – 2020 гг. Изучены территориальные и временные особенности распределения случаев бешенства животных, структура источников инфекции, показатели численности и плотности населения лисицы и енотовидной собаки – основных хозяев возбудителя. Установлено, что в начале XXI века эпизоотический процесс бешенства на территории региона претерпел значительные изменения. Число выявляемых заболеваний животных имеет тренд к выраженному снижению, наряду с чем отмечен рост заболеваемости домашних и сельскохозяйственных животных. Эпизоотии формируют стойкие очаги, локализуются преимущественно в зоне северной лесостепи и смешанных лесов. Наблюдаемую ландшафтную приуроченность полагаем связанной с изменением структуры населения хозяев инфекции и значительным ростом численности енотовидной собаки. Для оптимизации профилактических мероприятий требуется уделить внимание вакцинации

avvb_2021_03.indd 3 06.09.2021 7:52:18

всех групп животных, вовлечённых в эпизоотический процесс, продолжать оральную вакцинацию диких хищников, решить проблемы, связанные с недоучётом зимоспящих хищников, оценить их роль в циркуляции вируса бешенства.

Summary. *The analysis of the activity of epizootic and epidemic processes of rabies on the territory of the Omsk region in 2004 – 2020 was carried out. The territorial and temporal features of the distribution of cases of animal rabies, the structure of sources of infection, indicators of the number and density of the population of the fox and raccoon dog – the main hosts of the pathogen – have been studied. It has been established that at the beginning of the 21st century, the epizootic process of rabies in the region has undergone significant changes. The number of detected diseases of animals has a trend towards a pronounced decrease, along with which an increase in the incidence of domestic and farm animals has been noted. Epizootics form persistent foci, localized mainly in the zone of the northern forest-steppe and mixed forests. The observed landscape confinement is believed to be associated with a change in the structure of the population of the hosts of the infection and a significant increase in the number of raccoon dogs. To optimize preventive measures, it is necessary to pay attention to the vaccination of all groups of animals involved in the epizootic process, to continue oral vaccination of wild predators, to solve the problems associated with the underestimation of hibernating predators, and to assess their role in the circulation of the rabies virus.*

Введение

По результатам многолетнего эпизоотолого-эпидемического районирования Российской Федерации территория Омской области по состоянию на 2006, 2011 гг. относилась к средней зоне риска заражения бешенством [4, 7]. На 2018 год эпидемиологический риск инфекции для области оценен высоким [6].

Случаи нападения бешеных животных на людей не являлись редкостью. Только за последние 5 лет от нападения животных с лабораторно установленным бешенством пострадали и потребовали антирабической помощи 203 человека. В декабре 2020 года бешеная лисица напала на 14-летнюю школьницу в Любинском районе. Девочка была укушена в щёку и получила необходимую антирабическую помощь. По данным Омского Управления Россельхознадзора на начало августа 2021 года на территории области был выявлен уже 21 случай бешенства животных. Таким образом, мониторинг эпизоотолого-эпидемической ситуации по рабической инфекции на территории области сохраняет актуальность.

Материалы и методы

Для изучения эпизоотической ситуации на территории Омской области использованы данные о случаях заболевания животных в 2004 – 2020 гг. Проанализирована численность диких хищников за этот период. Материалы получены в Управлении Роспотребнадзора и Министерстве природных ресурсов и экологии Омской области, а также в Департаменте ветеринарии и ФГБУ «Центре ветеринарии» Министерства сельского хозяйства России, ФГБУ «Федеральном центре развития охотничьего хозяйства».

Для обработки и визуализации данных использован пакет статистического программного обеспечения Microsoft Excel. Картограммы выполнены при помощи QGIS Desktop 3.16.5. Пространственное распределение случаев бешенства у животных представили в виде теплокарт, отражающих их число в очаге, выполненных с помощью ПО Яндекс.Карты.

Результаты исследования и обсуждение

В Омской области с периода первой активизации природных очагов бешенства в регионе в 1962 г. до 2020 гг. было зарегистрировано 10 случаев гибели людей от рабической инфекции: в 1962, 1964, 1966 (3 случая), 1974, 1975, 1980, 1998 и 2004 гг. В шести из них заражение связано с диким животным (5 лисиц и 1 корсак), в трёх – с домашним (2 собаки и 1 кошка). Последний случай был зарегистрирован в 2004 г. Источник инфицирования установлен не был, предположительно им явилось сельскохозяйственное животное (КРС).

Все погибшие от гидрофобии в Омской области – жители сельской местности мужского пола в возрасте от 8 до 58 лет. Детей из общего числа трое (8, 13 и 15 лет). Никто из них не получил антирабической помощи: 9 человек за ней не обращались, а одному она не была назначена при укусе диким животным.

Динамика эпизоотий бешенства в Омской области с 1962 по 2007 гг. характеризовалась циклами длительностью от 2 до 7 лет [8].

avvb_2021_03.indd 4 06.09.2021 7:52:18

Нами проанализированы особенности современного эпизоотического процесса в 2004-2020 гг., в котором выделили три эпизоотических цикла (Рисунок 1):

– 2004-2009 гг. характеризуется подъёмом заболеваний животных в 2007 г. и максимальным числом выявленных случаев – 105;

– 2010-2014 гг. – подъем пришелся на 2010 г., в который зарегистрировали 58 больных животных;

– 2015-2020 гг. с подъёмом заболеваний животных в 2015 г. до 31 случая.

За изучаемый период в Омской области было зарегистрировано 574 больных бешенством животных. В каждый последующий период наблюдения число выявленных животных, больных бешенством, становилось почти вдвое меньше. Так, с 2004 по 2009 гг. это число составило 297 особей, с 2010 по 2014 гг. – 173, а с 2015 по 2020 гг. – 104. Число больных животных в год пиковой активности эпизоотического процесса в каждый последующий период сокращалось в 1,8 и 1,7 раз соответственно. При анализе динамики эпизоотического процесса нами установлена выраженная тенденция снижения числа заболевших животных. Это явление соответствует особенностям эпизоотического процесса, характерным для территории России на современном этапе [3, 4].

Известно, что с 1962 г. эпизоотии бешенства в Омской области традиционно начинали активизироваться в южных и юго-восточных районах. Затем наблюдалось волнообразное продвижение заболеваний животных на северо-запад от зоны степи и лесостепи к осиново-берёзовым лесам и тайге, связанное с миграцией основных источников вируса – лисицы и корсака. Единичные случаи бешенства спорадически регистрировали в районах лесной и таёжной зоны [8]. За последние 16 лет территориальное распределение бешенства животных в регионе изменилось (Рисунок 2). В 2004-2009 гг. наиболее активные очаги инфекции выявляли на территории центральной и северной лесостепи Большереченского и Муромцевского районов, где за пять лет от бешенства пало 47 и 29 животных соответственно. Ранее стойких очагов инфекции на территории этих районов не выявляли. Неблагополучными оставались также южно-лесостепные районы – Таврический и Кормиловский, где зарегистрирована гибель 36 животных – и Называевский район в зоне центральной лесостепи (25 животных). После частичного «выгорания» этих очагов с 2010 г. напряженность эпизоотической ситуации снизилась, с сохранением относительного неблагополучия на территории Знаменского, северной части Большереченского и южной части Тарского района в зоне лиственных и смешанных лесов, а также Называевского района, где очаг сохранялся более 40 лет наблюдений, хотя общее число заболеваний животных незначительно снижалось.

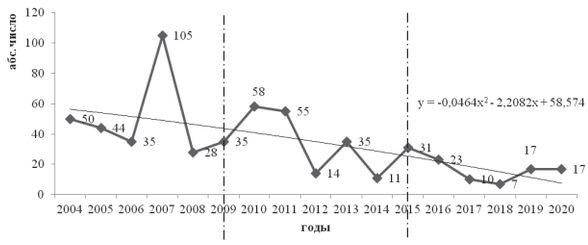


Рис. 1. Число зарегистрированных случаев бешенства животных в Омской области за 2004-2020 гг. (абс.).

Северные районы области с таёжными ландшафтами – Усть-Ишимский и Тевризский – благополучны по бешенству и свободны от инфекции на протяжении XX-начала XXI веков, за исключением спорадических заболеваний животных в 2007-2011 гг. С конца 1980-х годов не регистрировалось бешенство в Крутинском, за исключением трех случаев в 2010 г. и Исилькульском районе, где также появляются спорадические заболевания животных только в начале XXI века.

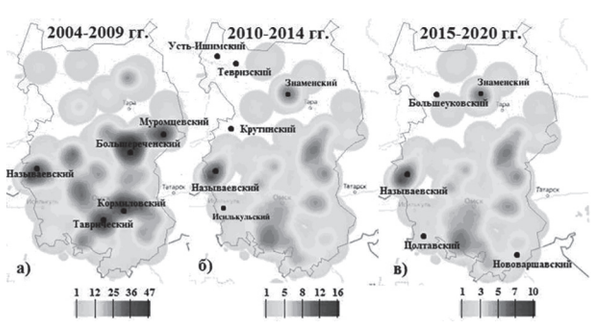


Рис. 2. Распределение зарегистрированных случаев бешенства животных по территории Омской обл. в 2004-2020 гг. Интенсивность цвета на карте пропорциональна числу зарегистрированных случаев бешенства животных в очаге (абс.).

avvb_2021_03.indd 5 06.09.2021 7:52:18

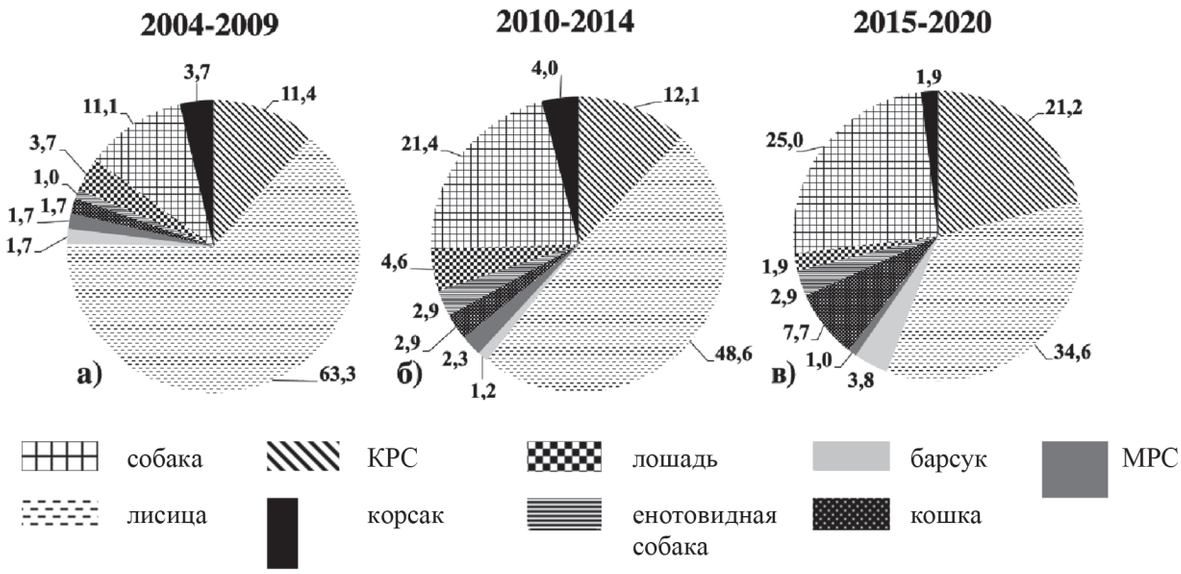


Рис. 3. Удельный вес различных видов животных в эпизоотиях бешенства в Омской обл. в 2004-2020 гг., %.

В течение 17 лет, с 2004 по 2020 гг., в стационарно неблагополучных ранее степных Полтавском и Большеуковском районах не регистрировалось бешенство диких животных, а в Нововаршавском – бешенство лисиц.

Из вышеописанного следует, что в последние 17 лет перестали наблюдать распространение эпизоотического процесса с юга на северо-запад, с периодическим снижением его напряженности, что наблюдалось ранее с 1962 г. В указанный временной период эпизоотии бешенства в области характеризовались появлением относительно стойких природных очагов инфекции в зоне северной лесостепи и таёжно-лесной подзоне.

В 2004-2020 гг. первое место в структуре заболеваемости животных занимала лисица, однако значение этого вида в настоящее время снижается на фоне увеличения удельного веса заболевающих собак, кошек и крупного рогатого скота [4, 6, 7, 9]. Так, доля лисиц среди павших от бешенства животных уменьшилась с 63,3 до 34,6%. Одновременно с этим значимо возрос удельный вес собак (с 11,1 до 25%), кошек (с 1,7 до 8%) и КРС (с 11,5 до 21,2%) (Рисунок 3).

Такое преобладание случаев бешенства среди собак и крупного рогатого скота наблюдалась на территории Омской области в 1960-1980 гг. [2]. Аналогичная структура источников инфекции была характерна в тот период для всей территории России [5, 9].

В структуре заболеваемости диких животных в изучаемый период также отмечались изменения. В эпизоотический процесс начала активно вовлекаться енотовидная собака, распространившаяся по территории Среднего Прииртышья в конце XX – начале XXI веков. Впервые этот хищник был замечен на территории области в 1994 г. в Павлоградском районе около оз. Алабота, а первая бешеная енотовидная собака в регионе была зарегистрирована в 2004 г. в Муромцевском районе. Доля этого хищника в структуре заболевших животных за 2004-2020 гг. выросла с 1 до 2,9%. Случаи бешенства енотовидных собак выявлялись на территориях максимального эпизоотического неблагополучия 2004-2009 гг. Это в первую очередь Большереченский, а также Муромцевский, Саргатский и Называевский районы.

В Омской области в настоящее время енотовидная собака находится в стадии биологического прогресса и активно наращивает свою численность. С 2004 по 2020 гг. поголовье хищника в регионе выросло с 0,8 до 8,4 тыс. особей. Максимальная численность зарегистрирована в 2018 г. и составила 10,2 тыс. особей. Очевиден тренд на дальнейший прирост числа этих животных.

Численность же лисицы, основного распространителя вируса бешенства, как в Омской области, так и во всей России, стабильна, варьирует от 9,3 до 5,7 тыс. особей,

avvb_2021_03.indd 6 06.09.2021 7:52:18

в среднем составляет 6,9 тыс. особей в год, с неизменным трендом (Рисунок 4).

Изменение территориального распространения енотовидной собаки и лисицы в оценено нами путём расчёта плотности популяций этих хищников в отдельных районах области (Рисунок 5,6). Енотовидная собака заселяет всё новые территории, и плотность её популяции возрастает. К 2020 г. хищник заселил всю область. Максимальная плотность его популяций в этом году оценивалась в Колосовском, Большереченском, Знаменском, Саргатском, Тюкалинском, Крутинском районах в пределах 110-190 особей на 1000 кв. км.

Абсолютная численность и плотность популяции лисицы в области на протяжении 2004-2020 гг. оставалась в состоянии гомеостаза и менялась в пределах 6,4-9,2 тыс. или 30-70 особей на 1000 кв. км соответственно.

Нарастание численности диких хищников в регионе, увеличение суммарной плотности их популяций, может способствовать активизации эпизоотического процесса. Это означает, что актуален постоянный мониторинг состояния природных очагов инфекции. И такая работа проводится совместно со специалистами Омского ЦГиЭ на базе нашего Референс-центра.

Особое внимание следует уделить оральной вакцинации диких животных, которая до 2019 г. системно на регулярной основе в регионе не проводилась. По данным ФГБУ «Центр ветеринарии», в 2019 г. в Омской области было разложено 108000, в 2020 – 202400 доз оральной вакцины.

Требует решения проблема значительного недоучёта зимоспящих хищных животных. Енотовидная собака является зимоспящим видом, поэтому её невозможно учесть методом зимнего маршрутного учета, как лисицу, корсака и других промысловых животных [1]. Этого зверя необходимо учитывать в весенне-летний период по выводковым и жилым убежищам. Сотрудники Референц-центра Российской Федерации по бешенству из Омского НИИ природно-очаговых инфекций в 2016 г. обучили этой методике охотоведческий коллектив области и способствовали организации учета численности барсука и попутно с ним енотовидной собаки. При проведении

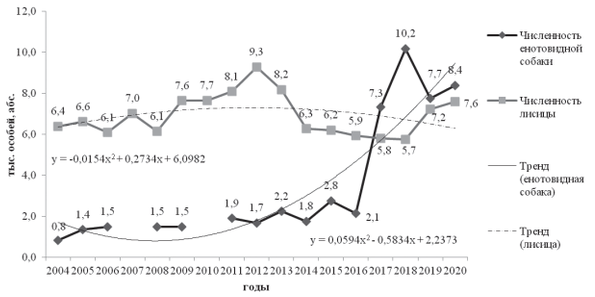


Рис. 4. Динамика численности енотовидной собаки и лисицы в 2004-2020 гг. (абс. число, тыс. особей).

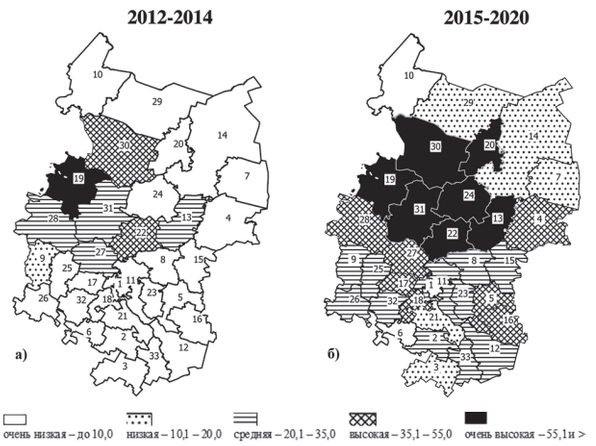


Рис. 5. Плотность популяции енотовидной собаки в районах Омской обл. в 2012-2020 гг. (особей на 1000 км²).

весенне-летних учетов численности наряду с зимоспящими хищниками проводится также учет лисицы, корсака и волка [10]. Выполнение такой работы позволит полноценно осуществить ревизию пространственно-временного состояния популяций диких хищников семейства псовых и барсука, что важно при планировании оральной антирабической вакцинации диких животных в регионе, а также для понимания их роли в эпизоотическом процессе бешенства и других заболеваний, общих для человека и животных.

Выводы

По результатам проведенной работы сделаны следующие выводы:

1. В настоящее время число выявляемых случаев заболеваний бешенством животных имеет тренд к выраженному снижению. При этом в последние 17 лет наблюдений эпизоотический процес в регионе претерпел значительные изменения.

2. Среди выявляемых больных бешенством животных, наряду с дикими, с 2010 года

avvb_2021_03.indd 7 06.09.2021 7:52:18

начинается рост заболеваемости домашних (собак и кошек) и сельскохозяйственных животных, как это наблюдалось ранее – до 1988 г. Это в очередной раз должно настраивать ветеринарую службу на необходимость постоянной вакцинации собак и кошек, а при необходимости и сельскохозяйственных животных.

3. До начала XXI века в области многократно регистрировали первоначальную активизацию эпизоотического процесса в южных степных и лесостепных районах и волнообразное продвижение эпизоотий на северо-запад. В настоящее же время эпизоотии бешенства в Омской области формируют стойкие очаги, локализуются преимущественно в зоне северной лесостепи и смешанных лесов. Современные территориальные особенности эпизоотического процесса, очевидно, связаны с изменением структуры населения диких хищников и значительным ростом численности енотовидной собаки в регионе.

4. На фоне значительного прироста численности и нарастания плотности популяции диких хищников (лисицы, ентововидной собаки) необходимо продолжать их оральную вакцинацию в соответствии с существующими рекомендациями.

5. Требует решения проблема недоучета в регионе зимоспящих видов – енотовидной собаки и барсука. В их отношении следует внедрить рекомендованные референс-центром методики весенне-летнего учёта численности по норам, а также проводить мониторинг спонтанной заражённости этих видов вирусом бешенства для оценки их вклада в эпизоотическую ситуацию.

Таким образом, изучение региональных особенностей эпидемического и эпизоотического процессов бешенства, взаимодействие практических структур и специалистов нашего НИИ будет способствовать оптимизации профилактических мероприятий по бешенству в нашем регионе.

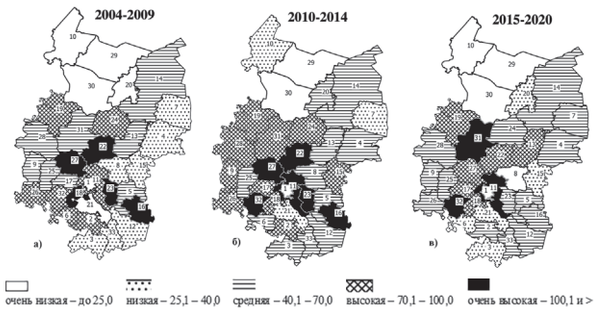


Рис. 6. Плотность популяции лисицы в районах Омской обл. в 2004-2020 гг.

Список литературы

1. Макаров В. В. Актуальные проблемы бешенства: природная очаговость, методология исследования и контроля в центре России / В. В. Макаров, А. А. Воробьев // Ветеринарная патология, 2004. № 3 (10). С. 102–116.

2. Околелов В. И. Методические рекомендации для ветеринарных специалистов и органов местного самоуправления Омской области по профилактике бешенства / В. И. Околелов, Е. М. Полещук, Г. Н. Сидоров, И. В. Кузьмин, Д. Г. Сидорова, Н. М. Колычев, Ю. В. Ерофеев. Омск: ГП Омская обл. типография. 157 с.

3. Полещук Е.М. Анализ особенностей эпизоотолого-эпидемической ситуации и риск заражения бешенством в Российской Федерации в начале XXI века / Е. М. Полещук, Г. Н. Сидоров // Проблемы особо опасных инфекций. 2020. № 4, С. 16–25.

4. Полещук Е. М. Бешенство в Российской Федерации / Е. М. Полещук, Г. Н. Сидоров, Е. М. Березина // Информационно-аналитический бюллетень. Омск: ФБУН НИИПИ Роспотребнадзора, ФГБОУ ВПО ОмГПУ, 2013. 64 с.

5. Полещук Е. М. Изменение особенностей эпизоотического процесса бешенства в России после многолетнего периода перепромысла основных хозяев рабической инфекции в конце XX века / Е. М. Полещук, Г. Н. Сидоров // Биологические ресурсы. Охотоведение. Сборник. научных тр. Ч. 1. Киров, 2010. С. 225–233.

6. Полещук Е. М. Бешенство в Российской Федерации / Е. М. Полещук, Г. Н. Сидоров, Д. Н. Нашатырева, Е. А. Градобоева, Н. Д. Пакскина, И. В. Попова // Информационно-аналитический бюллетень. Омск: ООО «Издательский центр КАН», 2019. 114 с.

7. Полещук Е. М. Бешенство в Российской Федерации / Е. М. Полещук, Г. Н. Сидоров, Д. Г. Сидорова, Н. М. Колычев // Информационно-аналитический бюллетень. Омск: НИИПОИ Роспотребнадзора, 2009. 48 с.

8. Сидоров Г. Н. Эпизоотический процесс бешенства на территории Омской области: современная характеристика / Г. Н. Сидоров, В. И. Околелов, Е. М. Полещук, Д. Г. Сидорова // Вестник Омского государственного аграрного университета. 2014 № 1 (13), январь-март. С. 67–72.

9. Сидоров Г. Н. Изменение роли млекопитающих в заражении людей бешенством в России за исторически обозримый период в 16–21 веках / Г. Н. Сидоров, Е. М. Полещук, Д. Г. Сидорова // Зоол. журн., 2019. Т. 98. № 4. С. 437–452.

10. Сидоров Г. Н. Определение видовой принадлежности хозяев нор и весенне-летние учеты численности хищных млекопитающих (*Carnivora*) в природных очагах бешенства / Г. Н. Сидоров, Е. М. Полещук, Д. Г. Сидорова // Зоологический журнал. 2021. Т. 100. № 9. С. 1066–1077.

avvb_2021_03.indd 8 06.09.2021 7:52:18

DOI 10.24412/2074-5036-2021-3-9-13
УДК: 639.215.2:574.24:574.625
Ключевые слова: катехоламины, рыбы, кровь, стресс, диагностика, тиляпия
Key words: catecholamines, fish, blood, stress, tilapia

Березина Д. И., Фомина Л. Л.

ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ КАТЕХОЛАМИНОВ В КРОВИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ СТРЕССА КАК БИОМАРКЕР У ТИЛЯПИЙ *OREOCHROMIS NILOTICUS*

CHANGES IN THE CONCENTRATION OF CATECHOLAMINES IN THE BLOOD IN A CONDITION OF AN EXPERIMENTAL MODEL OF STRESS AS A BIOMARKER IN TILAPIA OREOCHROMIS NILOTICUS

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Вологодская государственная молочнохозяйственная академия имени Н.В. Верещагина»
Адрес: 160555, Вологодская обл., г. Вологда, с. Молочное, ул. Шмидта, д. 2
Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Vologda State Dairy Farming Academy by N.V. Vereshchagin", Vologda Region, Vologda, Molochnoe, Shmidta Str., 2. Russia, 160555

Березина Дарья Игоревна, ассистент кафедры внутренних незаразных болезней, хирургии и акушерства, младший научный сотрудник «АкваБиоЦентр», e-mail vetxwork@gmail.com
Berezina Daria Igorevna, Assistant at Dept of Internal Noninfectious Diseases, Surgery and Obstetrics, Junior Researcher at "AquaBioCenter", e-mail vetxwork@gmail.com of Vologda SDFA
Фомина Любовь Леонидовна, кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры внутренних незаразных болезней, хирургии и акушерства ФГБОУ ВО Вологодской ГМХА им. Н.В. Верещагина, e-mail fomina-luba@mail.ru
Fomina Luybov Leonidovna, PhD of Biological Sciences, Associate Professor at Chair of Internal Noninfectious Diseases, Surgery and Obstetrics of Vologda SDFA, e-mail fomina-luba@mail.ru

Аннотация. В ихтиологической практике широко используется изучение стресс-реакций путем имитации стресса синтетическими кортикостероидами. В исследованиях экзогенного стресса у рыб интерпретация стрессового влияния, как правило, производится по повышению уровня эндогенного кортизола, однако синтетические кортикостероиды (дексаметазон, бетаметазон и др.) подавляют выработку эндогенного кортизола, в связи с чем возникает вопрос о том, является ли уровень катехоламинов крови рыб наиболее подходящим параметром для измерения уровня стресса в рамках таких исследований. В данной работе приведена динамика плазменного уровня катехоламинов (адреналина, норадреналина, дофамина и серотонина) при имитации острого и хронического стресса у тиляпии *O.niloticus* путем однократной инъекции дексаметазона первой экспериментальной группе и бетаметазона второй экспериментальной группе в сравнении с контрольной группой (без инъекции). Анализ сыворотки крови производился перед инъекцией, а также через 21 день после обработки. Выявлена широкая внутривидовая изменчивость уровней катехоламинов у тиляпий, а также не рекомендовано измерение уровня катехоламинов при гормональной модуляции стресса кортикостероидами за счет дороговизны, трудозатратности и чувствительности измерений, рекомендован дальнейший поиск стресс-маркеров в рамках исследований данного типа.

Summary. *In ichthyological practice, the study of stress responses by simulating stress with synthetic corticosteroids is widely used. In studies of exogenous stress in fish, stress effects are usually interpreted by increasing the level of endogenous cortisol. However, synthetic corticosteroids (dexamethasone, betamethasone, and others) suppress the production of endogenous cortisol, which raises the question of whether the catecholamine blood level of fish is the most appropriate parameter to measure the stress level in such studies. This paper describes the dynamics of plasma levels of catecholamines (adrenaline, noradrenaline, dopamine, and serotonin) under simulated acute and chronic stress in tilapia O. niloticus by a single injection of dexamethasone to the first experimental group and betamethasone to the second one against the control group (without injection). Serum analysis was performed before injection and 21 days after treatment. A wide intraspecific variation of catecholamine levels in tilapias was revealed. At the same time, measurement of catecholamine levels during hormonal modulation of stress by corticosteroids was not recommended due to expensive, labor-intensive and sensitive measurements. Further search for stress markers in this type of study was recommended.*

avvb_2021_03.indd 9 06.09.2021 7:52:18

Введение

В ихтиологической практике широко используется имитация стресса разной продолжительности для изучения тех или иных физиологических реакций, в основном иммунологических. Для этого вводят экзогенный кортизол [17], кортизон [3] или синтетические кортикостероиды – дексаметазон [1], триамцинолон [10], дезоксикортикостерон [4], бетаметазон [16].

В исследованиях естественного стресса у животных часто бывает трудно определить степень реакции в результате влияния различных стресс-факторов, и интерпретация этого влияния, как правило, производится по повышению уровня эндогенного кортизола. Ввиду большой трудоемкости процесса определения уровня катехоламинов крови у рыб, кортизол также зачастую используют в качестве классического стресс-маркера. Однако исследования влияния гормональной модуляции стресса у карпов показали, что эндогенный кортизол не является пригодным для оценки напряженности стресса, поскольку используемые гормоны частично или полностью блокируют выработку эндогенного кортизола [6]. Может возникнуть закономерный вопрос о том, является ли уровень катехоламинов наиболее подходящим параметром для измерения уровня стресса в рамках таких исследований у рыб.

У рыб, как и у млекопитающих, первичной реакцией на воздействие стрессора являются эндокринные изменения, включающие, прежде всего, выработку катехоламинов (адреналин и норадреналин) и глюкокортикоидов [8]. В результате возникают вторичные метаболические, осмотические и другие изменения [5]. Регулируется кортикальный ответ у костистых рыб гипоталамо-гипофизарно-интерренальной (HPA) осью [8].

Острый стресс приводит к массивному высвобождению катехоламинов из хромаффинных клеток, за которым следует быстрое изменение некоторых функций основных физиологических систем: дыхательной и сердечно-сосудистой [12]. Необходимое количество катехоламинов для проявления этих воздействий у рыб редко известно, поскольку химическое определение количеств адреналина и норадреналина затруднительно и требует больших объемов плазмы крови из-за их низкой концентрации. Их уровень чрезвычайно быстро реагирует на вылов и манипуляции (в пределах секунд), поэтому трудно количественно определить уровни катехоламинов без специального оборудования и животных, содержащихся в условиях лаборатории [14].

Кроме того, существует огромная межвидовая изменчивость уровней катехоламинов, достигнутых во время стресса, а также огромные расхождения в степени адренергической нейрональной иннервации тканей среди различных видов рыб [13]. Как замечает L. S. Smith, полученные результаты концентрации катехоламинов столь отличны друг от друга, что их трудно сопоставить с данными млекопитающих или делать на их основании какие-либо обобщения. Соотношение адреналина и норадреналина у рыб также значительно варьирует. У карпа катехоламины примерно на 70 % представлены норадреналином, у кижуча – адреналином, у некоторых рыб адреналина и норадреналина содержится поровну [15].

В связи с этим целью нашего исследования стала оценка пригодности измерения катехоламинов крови рыб как стресс-маркера при гормональной модуляции стресса. Для решения были поставлены следующие задачи: (1) определить уровень катехоламинов крови тиляпий при модуляции острого и хронического стресса и без гормональной обработки; (2) оценить динамику уровней катехоламинов с течением дней эксперимента у всех групп рыб; (3) оценить пригодность анализа катехоламинов для оценки степени напряженности гормониндуцированного стресса.

Материалы и методы

Работа выполнена в период 2019–2020 гг. в центре развития аквакультуры «АкваБиоЦентр» Вологодской ГМХА имени Н. В. Верещагина в рамках реализации гранта РФФИ №19-34-90109. Эксперимент проводили на нильской тиляпии *Oreochromis niloticus* L., выращенной в условиях «АкваБиоЦентра». Рыб каждого вида предварительно раздели-

avvb_2021_03.indd 10 06.09.2021 7:52:18

ли на три группы: рыбы с имитацией острого стресса (первая экспериментальная группа), рыбы с имитацией хронического стресса (вторая экспериментальная группа) и контрольные животные.

Для имитации острого стресса использовали дексаметазон-фосфат (4 мг/мл) [1], который метаболизируется в течение 4 часов. Животных однократно обрабатывали Дексаметазоном (Эллара, Россия) путем парентеральных инъекций в дозе 0,2 мл или 0,8 мг активного вещества дексаметазон-фосфата на особь.

В качестве глюкокортикоида, имитирующего хронический стресс, однократно применяли суспензию бетаметазона (2,63 мг бетаметазона натрия фосфата + 6,43 мг бетаметазона дипропионата/мл), период выведения которого более 10 дней. Рыбам инъецировали Дипроспан (Schering-Plough Labo N.V., Бельгия) по 0,5 мл на особь, что соответствует 3,5 мг активного вещества. Данные синтетические гормоны обладают аналогичным кортикостероидам эффектом. Контрольная группа оставалась интактной.

Рыб содержали в экспериментальной установке с обеспечением непрерывной циркуляции воды между аквариумами и принудительной аэрацией при температуре воды 28–30 °С.

Взятие крови у животных, участвующих в эксперименте, проводилось сразу же после акклиматизации, и далее через 21 день после инъекции препаратов.

Перед забором крови рыб анестезировали при помощи добавления в воду гвоздичного масла в дозе 0,033 мл/л [9] с последующей выдержкой в ней 15 минут.

Забор крови проводился пункцией хвостового гемального канала в пластиковые пробирки с гепарином и пластиковые пробирки с активатором свертывания и гелем. После забора крови осуществляли индивидуальное мечение рыб. Концентрацию катехоламинов в сыворотке крови устанавливали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в лаборатории ООО «Центр лабораторных исследований».

Полученные в ходе исследования результаты обрабатывались с помощью программного обеспечения Microsoft Excel и STATISTICA 12.0. Значения полученных результатов в работе представлены в виде средней величины и стандартной ошибки средней (M±m). Достоверность различий показателей крови для парных зависимых выборок использовали непараметрический критерий Вилкоксона.

Результаты исследований

Катехоламиновый ответ тиляпий на инъекции гормонов был неоднозначным и количественно представлен в таблице 1.

Содержание адреналина и норадреналина между рыбами одной группы очень сильно варьировалось (для адреналина 65–22500 пг/мл, для норадреналина 115-–5500 пг/мл), однако их уровни претерпели резкое снижение: адреналина – на 97,9–99 % (рисунок 1), норадреналина – на 80–92,2 % у всех групп рыб (рисунок 2) к 21 дню эксперимента.

При оценке изменений дофамина, обращала на себя внимание динамика концентрации дофамина: у контрольной группы она снизилась к концу эксперимента на 17 %, а у экспериментальных групп – повысилась на 5–15 %, хотя содержание данного гормона играет незначительную роль при оценке стрессорного воздействия в рамках данного эксперимента.

Обсуждение результатов

Как отмечают другие авторы, катехоламиновый ответ рыб на стресс в данный момент является наиболее трудозатратным для изучения, а также очень чувствительным к состоянию рыбы, транспортировке проб и методам количественного измерения концентраций катехоламинов. Уровень катехоламинов рыб чрезвычайно быстро реагирует на вылов и манипуляции (в пределах секунд), поэтому затруднительно оценить катехоламиновый ответ в спокойном состоянии до забора крови.

По нашим данным отмечается огромная внутривидовая вариабельность концентраций адреналина и норадреналина, особенно до стрессового воздействия.

Возможно, в результате анестезии и кратковременного хэндлинг-стресса (венепункция)

avvb_2021_03.indd 11 06.09.2021 7:52:18

Таблица 1

Катехоламины тиляпий в ходе эксперимента

Наименование показателя	До обработки			21-й день		
	контрольная группа (n=6)	первая экспериментальная группа (n=6)	вторая экспериментальная группа (n=6)	контрольная группа (n=6)	первая экспериментальная группа (n=6)	вторая экспериментальная группа (n=6)
Адреналин, пг/мл	11315,5± 11097,5	3149,33± 3066,87	7117,0± 6041,44	83,50± 23,50	65,25± 4,23*	92,50± 14,50
Норадреналин, пг/мл	1628,5± 1486,5	728,0± 603,03	2219,0± 1723,65	132,50± 17,50	140,25± 15,91	172,50± 57,50
Дофамин, пг/мл	36,00± 7,00	27,50± 0,50	29,50± 2,50	30,00± 3,00	31,75± 1,11	31,00± 4,00
Серотонин, г/мл	<3	<3	<3	<3	<3	<3

Примечание. Различия с показателем первой экспериментальной группы в тот же день эксперимента достоверны ($p \leq 0,05$); * – Различия с показателем второй экспериментальной группы в тот же день эксперимента достоверны ($p \leq 0,05$).

произошел всплеск катехоламинов у исследованных нами тиляпий, о чем говорит динамика к последнему дню эксперимента не только экспериментальных, но и контрольных значений. В связи с этим можно также предположить, что к концу эксперимента организм исследуемых животных адаптировался к кратковременным стрессовым условиям, или по каким-либо другим причинам, на что указывает падение уровня основных катехоламинов (адреналина и норадреналина) относительно первоначального у всех групп рыб.

В опытах по воздействию на рыб экзогенных стресс-факторов до стресса уровни катехоламинов у рыб обычно менее 10 нМ (100 пг/мл), после стресса колеблются от 4 до более 300 нМ (40–3000 пг/мл) [7]. По другим данным концентрации адреналина и норадреналина у рыб, испытывающих стресс от отлова, в среднем составляли более 36 000 пмоль/л (6 000 пг/мл), тогда как значения в состоянии покоя для обоих катехоламинов были менее 200 пмоль/л (35 пг/мл) [11]. На примере карпа: адреналин (эпинефрин) до стресса – 0,5 нМ (5 пг/мл), после – 16,2 нМ (162 пг/мл) соответственно; норадреналин (норэпинефрин) до стресса – 5,3 (53 пг/мл), после – 30,7 нМ (307 пг/мл) соответственно [7]. Й. Жигмонд при исследовании

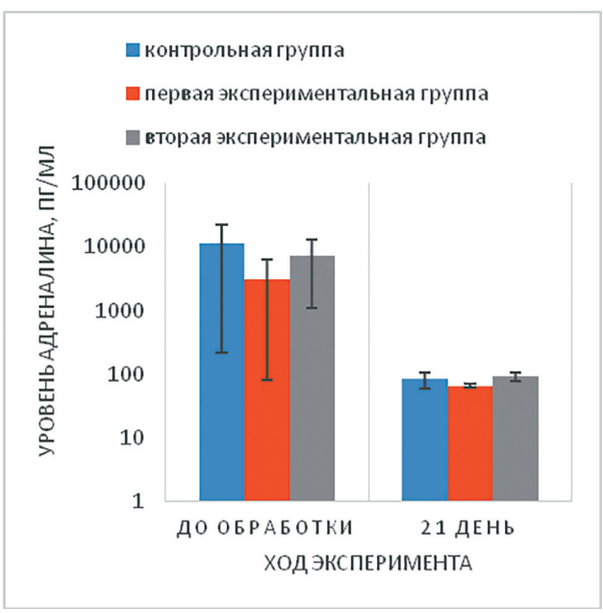


Рис. 1. Динамика уровня адреналина у тиляпий в ходе эксперимента.

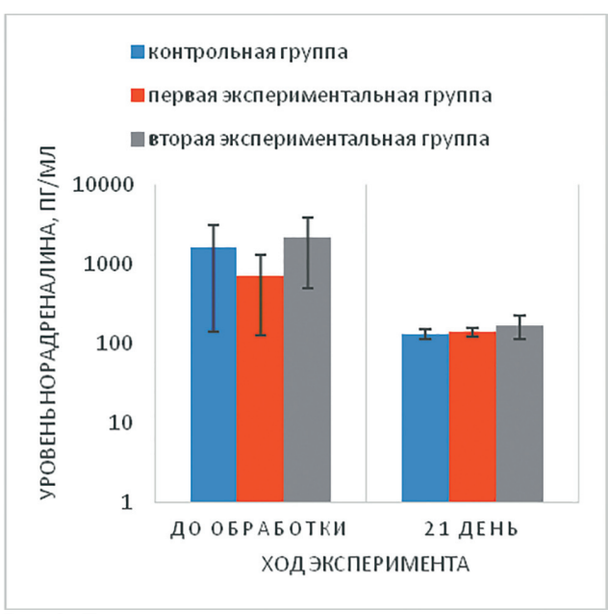


Рис. 2. Динамика уровня норадреналина у тиляпий в ходе эксперимента.

avvb_2021_03.indd 12 06.09.2021 7:52:18

различных стресс-стимулов также отмечал 2-х и 3-х кратное увеличение уровней адреналина и норадреналина в органах, тканях и плазме крови карпа [2], что противоречит результатам нашего исследования и, вероятно, связано с длительной продолжительностью выдержки рыб после первого взятия крови.

Авторский коллектив также советует помнить, что методы, применимые для исследования катехоламинов млекопитающих, могут не соответствовать реальному гормональному фону, так как эти методы высокочувствительны к условиям обработки проб и не стандартизированы для рыб.

Заключение

Обобщая основные результаты исследования, можно сказать, что, во-первых, у тиляпии (*Oreochromis niloticus*) существует огромная внутривидовая изменчивость уровней катехоламинов (адреналина и норадреналина). Во-вторых, при гормональной модуляции стресса кортикостероидами измерение уровня катехоламинов не является пригодными для установления напряженности вызываемых стресс-реакций по следующим причинам: дороговизна, трудозатратность и чувствительность к хэндлинг-стрессу, в связи с чем необходим дальнейший поиск стресс-маркеров в рамках исследований данного типа. Возможным вариантом таковых стресс-маркеров может стать уровень глюкозы крови, также довольно чувствительный к различным факторам, но более экономически выгодный.

Список литературы

1. Балабанова Л. В. Реакция лейкоцитов карпа *Cyprinus carpio* на гормониндуцируемый стресс / Л. В. Балабанова, Д. В. Микряков, В. Р. Микряков // Биология внутренних вод. 2009. №. 1. С. 91.

2. Жигмонд Й. Влияние стрессорных факторов рыбоводства на некоторые физиолого-биохимические показатели карпа: автореф. дис. ... к. б. н.: 03.00.18 / Й. Жигмонд. М.: МГУ им. Ломносова, 1990. 23 с.

3. Микряков В. Р. Реакция лейкоцитов стерляди *Acipenser ruthenus* на гормониндуцируемый стресс / В. Р. Микряков, Л. В. Балабанова, Д. В. Микряков // Вопросы ихтиологии. 2009. Т. 49. №. 4. С. 554–557.

4. Микряков Д. В. Влияние некоторых кортикостероидных гормонов на структуру и функцию иммунной системы рыб: автореф. дис. ... к. б. н.: 03.00.10, 14.00.36 / Д. В. Микряков. Москва, 2004. 24 с.

5. Barton B. A. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids / B. A. Barton, G. K. Iwama // Annual Review of fish diseases. 1991. Vol. 1. P. 3–26.

6. Berezina D. I. Evaluation of hormone-induced stress responses using endogenous cortisol in carp (*Cyprinus carpio*) / D. I. Berezina, L. L. Fomina // KnE Life Sciences. DonAgro: International Research Conference on Challenges and Advances in Farming, Food Manufacturing, Agricultural Research and Education. 2021. P. 47–56.

7. Gamperl A. K. Experimental control of stress hormone levels in fishes: techniques and applications / A. K. Gamperl, M. M. Vijayan, R. G. Boutilier // Reviews in Fish Biology and Fisheries. 1994. Vol. 4. №. 2. P. 215–255.

8. Gorissen M. The endocrinology of the stress response in fish: an adaptation-physiological view / M. Gorissen, G. Flik // Fish physiology. Academic Press, 2016. Vol. 35. P. 75–111.

9. Hamackova J. Clove oil as an anaesthetic for different freshwater fish species / J. Hamackova, J. Kouril, P. Kozak, Z. Stupka // Bulgarian Journal of Agricultural Science. 2006. Vol. 12. №. 2. P. 185.

10. Houghton G. Immunosuppression in juvenile carp, *Cyprinus carpio* L.: the effects of the corticosteroids triamcinolone acetonide and hydrocortisone 21-hemisuccinate (cortisol) on acquired immunity and the humoral antibody response to *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet / G. Houghton, R. A. Matthews // Journal of Fish Diseases. 1990. Vol. 13. №. 4. P. 269–280.

11. Ling N. Plasma catecholamines and erythrocyte swelling following capture stress in a marine teleost fish / N. Ling, R. M. G. Wells // Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology. 1985. Vol. 82. №1. P. 231–234.

12. Pavlidis M. Prothrombin time, activated partial thromboplastin time and fibrinogen values in Mediterranean marine teleosts / M. Pavlidis, M. Berry, C. Kokkari, M. Kentouri // Fish Physiology and Biochemistry. 1999. Vol. 21. №. 4. P. 335–343.

13. Perry S. F. The acute humoral adrenergic stress response in fish: facts and fiction / S. F. Perry, N. J. Bernier // Aquaculture. 1999. Vol. 177. №1–4. P. 285–295.

14. Schreck C. B. The concept of stress in fish / C. B. Schreck, L. Tort // Fish physiology. Academic Press, 2016. Vol. 35. P. 1–34.

15. Smith L. S. Introduction to fish physiology / L. S. Smith. TFH, 1982. 352 p.

16. Swift D. J. Changes in selected blood component values of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, following the blocking of the cortisol stress response with betamethasone and subsequent exposure to phenol or hypoxia / D. J. Swift // Journal of Fish Biology. 1982. Vol. 21. №. 3. P. 269–277.

17. Van Weerd J. H. The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal / J. H. Van Weerd, J. Komen // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 1998. Vol. 120. № 1. P. 107–112.

avvb_2021_03.indd 13 06.09.2021 7:52:18

DOI 10.24412/2074-5036-2021-3-14-18
УДК: 619:616.937.5
Ключевые слова: рецепторы, вирус, лимфоциты, лейкоз, овцы
Key words: receptors, virus, lymphocytes, leukemia, sheep

Григорьев А. Г., Ездакова И. Ю., Капустина О. В., Белоусова Р. В.

СУБПОПУЛЯЦИОННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ОВЕЦ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЗАРАЖЕНИИ ВИРУСОМ ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

SUBPOPULATION CHARACTERISTICS OF SHEEP BLOOD LYMPHOCYTES IN EXPERIMENTAL INFECTION WITH BOVINE LEUKEMIA VIRUS

ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук».
Адрес: 109428, Россия, г. Москва, Рязанский просп., 24, корп. 1
Federal State Budget Scientific Institution «Federal Scientific Centre VIEV» (FSC VIEV)
Address: 24, Ryazan ave., 1, Moscow, 109428, Russia

Григорьев Артём Геннадьевич, аспирант. E-mail: griartis.viev@yandex.ru
Grigoriev Artem Gennadievich, Post-Graduate student. E-mail: griartis.viev@yandex.ru
Ездакова Ирина Юрьевна, д. б. н., заведующая лабораториейи иммунологии. E-mail: ezdakova.i@viev.ru
Ezdakova Irina Yuryevna, Doctor of Biological Sciences, Head of Laboratory of Immunology. E-mail: ezdakova.i@viev.ru
Капустина Ольга Владимировна, д. в. н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии. E-mail: olgakapustina2010@yandex.ru
Kapustina Olga Vladimirovna, Doctor of Veterinary Sciences, Senior Researcher ofat the Laboratory of Immunology. E-mail: olgakapustina2010@yandex.ru
Белоусова Раиса Васильевна, доктор ветеринарных наук. E-mail: rvbelousova@mail.ru
Belousova Raisa Vasilyevna, Doctor of Veterinary Sciences. E-mail: rvbelousova@mail.ru

Аннотация. В настоящей работе представлен анализ динамики иммунокомпетентных клеток крови овец различного возраста при экспериментальном заражении вирусом лейкоза крупного рогатого скота. Показано, что иммуногенез сопровождается увеличением числа $CD5^+$-лимфоцитов на 12-е сутки у обеих групп животных. В течение 20 суток иммунного ответа, вирус вызывает стабильное снижение уровня В-клеток, которые являются его основной мишенью. На 12-е сутки после заражения отмечалось кратковременное повышение содержания CD^8+-клеток и естественных киллеров у взрослой группы животных. У молодых животных количественный профиль субпопуляций лимфоцитов отличается от показателей взрослых животных, что, показывает различный ответ организма на введение вируса в возрастном аспекте на ранней стадии развития болезни.

Summary. *This work presents an analysis of the dynamics of immunocompetent blood cells of sheep of various ages during experimental infection with the bovine leukemia virus. It was shown that immunogenesis was accompanied by an increase in the number of CD^5+ lymphocytes on the 12th day in both groups of animals. Within 20 days of the immune response, the virus causes a stable decrease in the level of B-cells, which are its main target. On the 12th day after infection, there was a short-term increase in the content of CD^8+ cells and natural killer cells in the adult group of animals. In young animals, the quantitative profile of lymphocyte subpopulations differs from the indicators of adult animals, which shows a different response of the organism to the introduction of the virus in the age aspect at an early stage of the development of the disease.*

Введение

Согласно современным теориям иммунитета, ведущая роль в противовирусной защите принадлежит иммунокомпетентным клеткам. Известно, что мишенью BLV являются не только В-клетки, но и CD^5+-лимфоциты, рецепторная характеристика которых не позволяет четко определить их статус. CD^5-антиген может экспрессироваться как на В-клетках, так и Т-клетках [5, 8]. Вирус лейкоза крупного рогатого скота (BLV) был открыт достаточно давно, но патогенез болезни на клеточном уровне и его адаптация к другим видам животных изучены пока недостаточно.

avvb_2021_03.indd 14 06.09.2021 7:52:18

После экспериментального заражения BLV у овец через 1,5 года развивается стойкий В-клеточный лимфоцитоз, а через 2,5 года после заражения появляются опухоли типичные для этой болезни (симптомы лимфосаркомы) [6, 7, 9]. К тому же лейкоз овец вызывает почти 100 % летальность, по сравнению с 5 % у крупного рогатого скота (КРС). У последних лейкемия может возникнуть через 8–10 лет с момента заражения, и только у 20–30 % инфицированных разовьётся персистирующий лимфоцитоз (PL) [4, 9, 10]. У взрослых коров PL проявляется увеличением числа В-клеток [5, 9], у телят же в первую неделю после заражения наблюдается рост числа В-клеток с фенотипом IgM^+CD^5+ (В-1-лимфоциты) [1, 3]. Ввиду более быстрого и агрессивного течения лейкоза у овец, представляет особый интерес изучение лимфоцитарного профиля иммунного ответа [4, 9].

Целью работы был анализ количественной динамики Т-, В-клеток и естественных киллеров в крови овец разных возрастных групп для изучения механизмов формирования иммунного ответа на ретровирусную инфекцию у овец романовской породы.

Материалы и методы

Для заражения овец использовали кровь от BLV-положительной коровы (16000 лейкоцитов/мкл). 10 голов овец романовской породы были разделены на две группы: 1 группа овцы в возрасте 6–7 лет (5 голов) и 2 группа – овцы 3–4-месячного возраста (5 голов). Клетки крови овец исследовали до заражения и на 1-е, 3-е, 5-е, 7-е, 10-е, 12-е, 14-е и 20-е сутки после заражения. Из свежевыделенной крови выделяли лимфоциты методом центрифугирования в градиенте плотности фиколла (d=1,077). Лимфоциты ($0,5\text{-}1,0x10^6$) по 30 мкл вносили в 10-луночные предметные стёкла, фиксировали этиловым спиртом. Для регидратации клеток после фиксации использовали физиологический раствор. Для блокирования эндогенной пероксидазы использовали 1 % перекись водорода, а для блокировки неспецифических сайтов связывания – 1 % BSA. Для идентификации клеток использовали метод иммунопероксидазного окрашивания лимфоцитов (ИПО) с моноклональными антителами к $CD20^+$, $CD16^+$ $CD8^+$, $CD5^+$ и $CD4^+$ лимфоцитам человека в рабочем разведении, согласно инструкции производителя (ООО «Сорбент»). В качестве вторичных антител использовали ПХ конъюгат овечьих IgG к Ig мыши в разведении 1:400 в ЗФР-БСА буфере pH 7,2–7,4. В качестве субстрата использовали 3-амино-9-этил карбазол. Идентификацию клеток проводили с помощью светового микроскопа Zeiss AXI0 Scope.A1. Для определения концентрации иммуноглобулинов классов M, G и A в сыворотке крови овец использовали метод простой радиальной иммунодиффузии (РИД).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Excell (Microsoft, USA) и Statistica 8.0.

Результаты исследования и обсуждение

Изменения субпопуляционного профиля иммунокомпетентных клеток овец при введении вируса лейкоза крупного рогатого скота являются ответом иммунной системы на проникновение чужеродного агента в организм.

Относительное количество В-лимфоцитов у овец обеих групп до заражения BLV находилось в пределах физиологической нормы (11–50 %) [11] и у взрослых животных (1 группа) составляло 32,0±2,2 %, а у молодых 18,0±4,3 %.

После заражения отмечалось снижение уровня В-клеток ($CD20^+$) на протяжении всего изучаемого периода с небольшим увеличением на 12-е сутки как в первой, так и во второй группах животных (рис. 1). На 7-е и 14-е сутки число В-лимфоцитов снизилось до 2,0±0,6 % и 8,4±3,2 % у взрослых и до 2,0±1,09 % и 9,2±3,7 % у молодых овец, соответственно. Несмотря на более значимую роль клеточного иммунитета при вирусных инфекциях, хорошо известно участие гуморального звена в защитных реакциях организма. При онкогематологических патологиях изменяется содержание и активность полиспецифических иммуноглобулинов, что ассоциируется с неблагоприятным прогнозом заболевания. На 7-е сутки иммунного ответа концентрация IgG у 1-ой группы овец составила 24,4±2,3 мг/мл, а у 2-ой группы

avvb_2021_03.indd 15 06.09.2021 7:52:19

увеличилась с 10,0±2,0 мг/мл до 12,0±0,9 мг/мл [2]. Концентрация IgA в сыворотке крови на протяжении всех 20-ти суток значительных изменений не претерпевала [2], и, судя по всему, сывороточный IgA на ранней стадии развития экспериментальной инфекции не имеет определяющего значения, что может быть связано со способом введения вируса в организм. Известно, что у телят гуморальный иммунный ответ развивается в течение первых дней после заражения. У экспериментально инфицированных BLV телят в сыворотке крови высокий уровень IgM был установлен на 5–7-е сутки, что говорит о начале гуморального иммунного ответа [1]. У опытных групп овец на протяжении всего эксперимента не было установлено каких-либо значимых изменений в концентрации антител данного класса, что связано с особенностями течения лейкоза у овец.

Количественная динамика $CD20^+$-лимфоцитов отличается более низкими параметрами у 2-ой группы, что, скорее всего, объясняется возрастными особенностями и не до конца сформированной иммунной системой у молодых животных. Ввиду преимущественного тропизма вируса лейкоза к В-лимфоцитам и снижение их числа, вероятнее всего, может привести к недостаточной выработке нейтрализующих антител, что может усугубить течение болезни.

Известно, что $CD5^+$-клетки временно увеличиваются в период латентного течения болезни в периферической крови и лимфоидных органах овец в начальную и промежуточную стадии лейкоза. Количество $CD5^+$- лимфоцитов в крови овец до заражения составляло 9,3±0,6 % у взрослых и 7,1±0,5 % у молодых овец (рис. 1), что превышало значения нормы для овец в возрасте 9–12 месяцев (3,98±0,9 %) [8]. Нарастание числа $CD5^+$-клеток было установлено на 1-е и 12-е сутки эксперимента у взрослых и на 12-е у молодых овец.

Рост количества $CD5^+$-клеток в этот период можно объяснить цикличным профилем лимфоцитоза, который так же характерен для коров на первых этапах развития болезни [8]. Похожая картина наблюдалась и при экспериментальном заражении телят, у которых увеличение числа $CD5^+$-лимфоцитов происходило на 14-е сутки первичного иммунного ответа [3, 4].

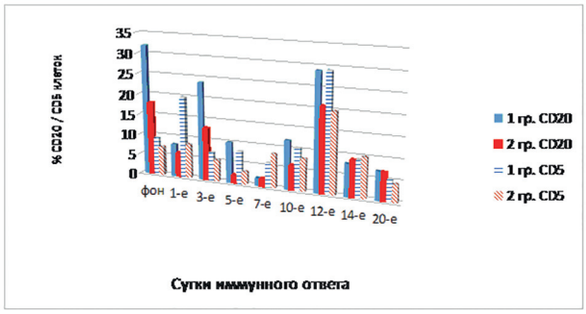


Рис. 1. Количественная характеристика $CD20^+$- и $CD5^+$-клеток в процессе иммунного ответа.

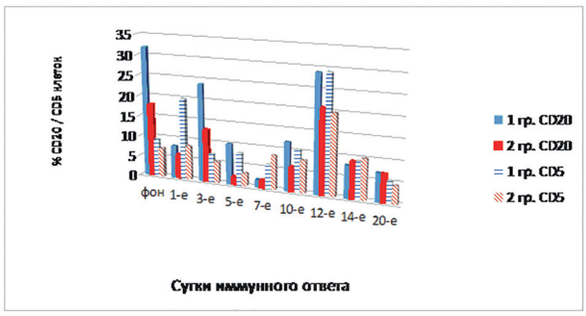


Рис. 2. Количественная характеристика CD8- и CD4-лимфоцитов в процессе иммунного ответа.

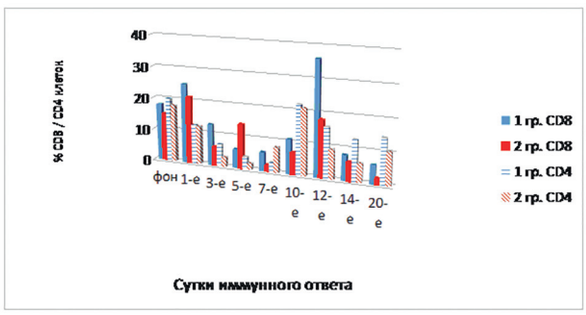


Рис. 3. Количественная характеристика $CD16^+$-лимфоцитов в процессе иммунного ответа.

Известно, что вирус лейкоза крупного рогатого скота, помимо В-клеток, может инфицировать $CD4^+$- и $CD8^+$ -лимфоциты, количество которых может изменяться в процессе болезни [6]. В результате проведенных исследований установлено, что количество Т-хелперов до заражения находилось в пределах физиологической нормы (8–22 %) [11] и у взрослых овец составляло 20,0±0,3 %, а у молодых 18,0±2,5 %. После заражения отмечалось некоторое снижение уровня $CD4^+$-лимфоцитов, но на 10-е сутки у 1-ой группы показатели повысились с 3,0±0,8 % (7-е сутки) до 22,0±6,7 %, а у 2-ой группы животных с 8,0±2,6 % (7-е сутки) до 21,0±6,0 %, а затем снова снизились к 20-м суткам.

avvb_2021_03.indd 16 06.09.2021 7:52:19

Динамика В-клеток в процессе иммунного ответа коррелирует с профилем Т-хелперов, что подтверждает их тесную взаимосвязь при инфицировании организма [5]. Параллельно с тем, что процент Т-хелперов оставался практически без изменений, при подсчёте количества $CD8^+$-лимфоцитов было установлено достоверное увеличение их числа на 12-е сутки иммунного ответа у взрослых овец (36,4±10,0 %). Количество $CD8^+$-клеток до заражения находилось в пределах физиологической нормы (4–22 %) [11] и у взрослых овец составляло 18,0±1,3 %, а у молодых 15,0±0,2 % (рис. 2). На первые сутки после заражения отмечалось нарастание числа CD8+-клеток (25,5±1,9 %) в 1-ой и во 2-ой группе овец (21,2±1,2 %), что может свидетельствовать о прайминге цитотоксических лимфоцитов, напрямую уничтожающих инфицированные вирусом клетки. Количество $CD8^+$-лимфоцитов у взрослых овец в сравнении с фоном на 1-е сутки увеличилось на 7 %, а у молодых на 6 %. К 12-м суткам иммунного ответа относительное содержание цитотоксических Т-лимфоцитов повысилось на 18 % в первой и на 3 % во второй группе животных.

Характер изменений уровня лимфоцитов, экспрессирующих рецептор CD16, играющий важную роль в цитотоксических иммунных реакциях, был различен у опытных групп животных. Количество $CD16^+$-лимфоцитов у взрослых овец до заражения находилось в пределах физиологической нормы (7,5–12,6 %) [9] и составляло 12,0±2,4 %, в то время, как у молодых число этих клеток было ниже – 6,2±0,12 %.

Уровень $CD16^+$-лимфоцитов у молодых животных достоверно не повышался, а на 7-е и 20-е сутки резко снижался (рис. 3). Вероятно, это связано с низкими фоновыми показателями данных клеток в периферической крови молодых животных, что может способствовать усилению вирусной инфекции. Естественные киллеры подобно макрофагам способны вызывать гибель клеток-мишеней опсонизированных IgG (антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность) [9]. Повышение уровня общих иммуноглобулинов класса G на 7-е сутки после заражения привело к временному нарастанию числа эффекторных $CD16^+$-клеток на 12–14-е сутки в 1-ой группе животных. Внутримышечное введение овцам крови инфицированной BLV коровы, по-видимому, не вызывает достаточной активации врожденного звена иммунитета в первые 10 суток после экспериментального заражения для подавления вирусной инфекции.

Заключение

В результате проведенных исследований, было показано, что клетки овец с фенотипом $CD5^+$ / $CD20^+$ являются наиболее уязвимыми мишенями BLV. Установлено, что развитие иммунного ответа при экспериментальном заражении овец вирусом лейкоза крупного рогатого скота зависит от степени зрелости иммунной системы. Достоверных значений увеличения числа иммунокомпетентных клеток крови у молодых овец не было зарегистрировано. Параллельно было установлено значительное снижение числа В-, Т-, $CD16^+$-клеток в первые сутки инфекции. Это может играть как отрицательную (недостаточность иммунного ответа), так и положительную роль (уменьшение иммунопатологических реакций) в иммуногенезе. При анализе данных о влиянии BLV на клетки взрослых животных не выявлено достоверного увеличения их количества в первые 10 суток иммунного ответа, кроме возрастания числа $CD5^+$-клеток. Такая задержка ответа иммунокомпетентных клеток на инфекцию может в дальнейшем утяжелить лейкозный процесс. Вероятно, это следует рассматривать как результат адаптации вируса в клетках крови овец, экологической нишей которого является крупный рогатый скот.

Список литературы

1. Гулюкин М. И. Выявление специфических антител классов G и M к вирусу лейкоза крупного рогатого скота в сыворотках крови / М. И. Гулюкин, О. В. Капустина, И. Ю. Ездакова, Т. В. Степанова, М. Аноятбеков // Вопросы вирусологии. №4, 2019. С. 173–177. DOI: 10.36233/0507-4088-2019-64-4-173-177.

2. Григорьев А. Г. Динамика иммунного ответа при экспериментальном заражении овец вирусом лейкоза крупного рогатого скота. /

avvb_2021_03.indd 17 06.09.2021 7:52:19

А. Г. Григорьев // Ветеринария и кормление. №6, 2020. С. 16–18. DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2020-6-4.

3. Ездакова И. Ю. Характеристика В1-клеток в процессе экспериментального лейкомогенеза / И. Ю. Ездакова, О. В. Капустина, М. И. Гулюкин, Т. В. Степанова// Вопросы вирусологии. Т. 65, №1, 2020. С. 35–40. DOI: 10.36233/0507-4088-2020-65-1-35-40.

4. Ездакова И. Ю. Определение В-клеток в крови крупного рогатого скота методом иммунопероксидазного окрашивания / И. Ю. Ездакова, О. В. Капустина // Российская сельскохозяйственная наука. 2018. № 3. С. 40–43.

5. Ездакова И. Ю. Рецепторный профиль лимфоцитов крови вакцинированных овец / И. Ю. Ездакова, О. В. Капустина, С. В. Вальциферова // Ветеринария и кормление. 2019. № 4. С. 8–10. DOI: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2019-4-2.

6. Arnaud F. Emphasis on cell turnover in two hosts infected by bovine leukemia virus: A rationale for host susceptibility to disease / F. Arnaud, B. Mathieu, V. Fabian, O. Verlaeten [et al.] // Veterinary Immunology and Immunopathology. 2008. Vol. 125. № 1–2. P. 1–7. DOI: 10.1016/j.vetimm.2008.04.007.

7. Barez P.-Y. Recent Advances in BLV Research / P.-Y. Barez, D. A. Brogniez, A. Carpentier, H. Gazon, N. Gillet [et al.] // Recent Advances in BLV Research. Viruses. 2015, Vol. 7. P. 6080–6088. DOI:10.3390/v7112929.

8. Masahiko T. Ex vivo survival of peripheral blood mononuclear cells in sheep inducedby bovine leukemia virus (BLV) mainly occurs in CD5–B cells that express BLV / T. Masahiko, T. Shigeru, S.-N. Takeshima, K. Satoru, S. A. Yin, O. Kosuke, C. D. William, A. Yoko // Microbes and Infection. 2004. Vol. 6. № 6. P. 584–595.

9. Elhmouzi-Younes J. Ovine $CD16^{+}$ / CD14- blood lymphocytes present all the major characteristics of natural killer cells / J. Elhmouzi-Younes, P. Boysen, D. Pende, A. K. Storset [et al.] // Vet. Res. 2010. Vol. 41. № 1. P. 1–12. DOI: 10.1051/vetres/2009052.

10. Porta N. G. Experimental infection of sheep with Bovine leukemia virus (BLV): Minimum dose of BLV-FLK cells and cell-free BLV and neutralization activity of natural antibodies / N. Gabriela Porta, I. Alvarez, G. Suarez Archilla [et al.] // Rev Argent Microbiol. 2019. Vol. 51. № 4. P. 316-–323. DOI:10.1016/j.ram.2019.01.004.

11. Tizard I. Veterinary Immunology: An Introduction / I. Tizard // Philadelphia, W.B. Saunders Cp. Harcount Brace Jovanovich Inc. 2013. Vol. 1. P. 512.

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 2022 г. согласно инф. письму б/н от 03.09.18 г. НДС не облагается. Адрес подписки: ...»

Стоимость редакционной подписки на 2022 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

DOI 10.24412/2074-5036-2021-3-19-27
УДК 619:578.835.2:615.371.004.12:616-076
Ключевые слова: концентрация рибонуклеопротеина вируса бешенства, антирабическая вакцина, амплификация, гибридизационно-флуоресцентная детекция ампликонов.
Keywords: rabies virus ribonucleoprotein concentration, rabies vaccine, amplification, hybridization-fluorescent detection of amplicons.

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

ОПОСРЕДОВАННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНА ВИРУСА БЕШЕНСТВА В СЫРЬЕ ДЛЯ ВАКЦИН МЕТОДОМ АМПЛИФИКАЦИИ И ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИИ АМПЛИКОНОВ

MEDIATED DETERMINATION OF THE RIBONUCLEOPROTEIN CONCENTRATION OF THE RABIES VIRUS IN RAW MATERIALS FOR VACCINES BY AMPLIFICATION AND HYBRIDIZATION-FLUORESCENT DETECTION OF AMPLICONS

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

Доронин М.И., к. б. н., вед. науч. сотрудник. E-mail: doronin@arriah.ru
Doronin M.I., PhD in Biological Science, Leading Researcher. E-mail: doronin@arriah.ru
Михалишин Д.В., к. в. н., зав. лабораторией. E-mail: mihalishindv@arriah.ru
Michalishin D.V., PhD in Veterinary Science, Head of the Laboratory. E-mail: mihalishindv@arriah.ru
Мудрак Н.С., д. б. н., главный научный сотрудник. E-mail: mudrak@arriah.ru
Mudrak N.S., Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher. E-mail: mudrak@arriah.ru
Борисов А.В., к. в. н., вед. науч. сотрудник. E-mail: borisov_av@arriah.ru
Borisov A.V., PhD in Veterinary Science, Leading Researcher. E-mail: borisov_av@arriah.ru
Груздев К.Н., д. б. н., профессор, Заслуженный ветеринарный врач РФ, трижды Лауреат Премии Правительства РФ в области науки и техники. E-mail: gruzdev@arriah.ru
Gruzdev K.N., Doctor of Biological Science, Professor, Honored Veterinarian of the Russian Federation, three times Laureate of the Prize of the Government of the Russian Federation in the field of science and technology. E-mail: gruzdev@arriah.ru

Аннотация. В процессе производства антирабических вакцин вируссодержащее сырье исследуют для определения концентрации важного иммуногенного компонента, рибонуклеопротеина вируса бешенства. В статье описана разработка и апробирование нового способа опосредованного определения его концентрации в сырье для вакцин с применением метода амплификации и гибридизационно-флуоресцентной детекции ампликонов. Разработанный способ позволяет сократить время исследования до 3–4 ч; исключить вероятность контаминации; увеличить чувствительность и специфичность за счет применения высокоспецифичных оригинальных олигонуклеотидов. Между концентрацией рибонуклеопротеина вируса бешенства и пороговым циклом амплификации установлена зависимость: $C_{RNP\ ВБ} = -0{,}3002 \times C_t + 8{,}81$, отраженная в виде линейной функции с высокими достоверностью аппроксимации ($R^2 = 0{,}9984$) и эффективностью амплификации 99,83 %. Аналитическая чувствительность метода составила 10 нг/мл, чувствительность – 99,48 % (n=386), специфичность – 100,00 % (n=386), общая точность – 99,74 % (n=386). Проведено исследование прецизионности представленного способа в условиях воспроизводимости. Определены незначительная степень отклонений индивидуальных значений порогового цикла амплификации от среднего арифметического, а также высокий уровень достоверности данных внутри каждой выборки. Коэффициент осцилляции составил 0,361–2,207 %, линейный коэффициент вариации – 0,041–0,169 %, коэффициент вариации – 0,044–0,169 %, что соответствует общепринятым нормам ($C\delta < 3$ %).

Summary. *During the production of rabies vaccines, virus-containing raw materials are examined to determine the concentration of such an immunogenic component as the ribonucleoprotein of the rabies virus. The article describes the development and testing of a new method for indirect determination of the concentration of rabies virus ribonucleoprotein in raw materials for vaccines using the amplification method and hybridization-fluorescent detection of amplicons, which reduces the study time to 3–4 hours; eliminate the likelihood of contamination; increase the sensitivity and specificity*

avvb_2021_03.indd 19 06.09.2021 7:52:19

through the use of highly specific original oligonucleotides. Between the concentration of ribonucleoprotein of the rabies virus and the threshold amplification cycle, the relationship $C_{RNP\ RV} = -0.3002 \times C_t + 8.81$ was established, reflected as a linear function with a high accuracy of approximation ($R^2 = 0.9984$) and an amplification efficiency of 99.83 %. The analytical sensitivity of the method was 10 ng/ml, the sensitivity of the method was 99.48 % (n = 386), the specificity was 100.00 % (n = 386), and the overall accuracy was 99.74 % (n = 386). A study of the precision of the presented method was carried out under reproducibility conditions, and an insignificant degree of deviation of individual values of the threshold cycle of amplification from the arithmetic mean was determined, as well as a high level of data reliability within each sample. The oscillation coefficient was 0.361–2.207 %, the linear coefficient of variation was 0.041–0.169 %, the coefficient of variation was 0.044–0.169 %, which corresponds to generally accepted norms (Cδ < 3 %).

Введение

Бешенство по своей природе является острым вирусным энцефалитом с почти 100%-ной летальностью, что является очень высоким показателем среди известных инфекционных заболеваний [2]. Возбудителем данной болезни является вирус бешенства порядка *Mononegavirales* семейства *Rhabdoviridae* рода *Lyssavirus* вида *Rabies lyssavirus*. Геном вируса представлен несегментированной одноцепочечной негативной молекулой РНК длиной около 12 000 н. о. Нуклеиновая кислота кодирует 5 основных белков, расположенных в консервативном линейном порядке: нуклеопротеин (N-белок), фосфопротеин (P-белок), матриксный белок (M-белок), гликопротеин (G-белок), РНК-зависимую РНК-полимеразу (L-белок) [9]. Вирион вируса бешенства имеет пулевидную форму длиной 130–250 нм и диаметром 60–100 нм. Он состоит из следующих функциональных структур: RNP-комплекс (рибонуклеопротеин), расположенный внутри вириона, и внешняя белково-липидная составляющая. RNP-комплекс представляет собой внутренний нуклеокапсид, который включает в себя геномную РНК, прочно связанную с нуклеопротеидом и фосфопротеином, а также вирусную полимеразу. Рибонуклеопротеин является важным иммуногенным компонентом вакцинных препаратов против бешенства. В RNP-комплексе содержится 4 % РНК к 96 % белка [2]. Снаружи вириона располагается двухслойная липидная оболочка с «шипами» гликопротеина. Матричный белок находится между RNP-комплексом и внешней составляющей вириона, конденсирует нуклеопротеин и взаимодействует с эндодоменом гликопротеином [12]. Единицы транскрипции разделены короткими нетранслируемыми межгенными областями. Исключение составляет межгенная область G-L, которая состоит из 400–700 нуклеотидов и может представлять собой остаток гена, который потерял свою функциональность во время эволюции лиссавирусов [10].

Белки вируса бешенства полифункциональны. Нуклеопротеин защищает вирусный геном от активности клеточной РНКазы и взаимодействует с L- и P-белками во время транскрипции и репликации. Фосфопротеин отвечает за правильное позиционирование L-белка и действует как шаперон во время синтеза нуклеопротеина, образуя N-P-комплекс, который предотвращают самоагрегацию N-белка и связывание с клеточной РНК [12]. Матриксный белок является структурным элементом, который связывается с рибонуклеопротеином и цитоплазматическим доменом гликопротеина для облегчения процесса сборки вирусных частиц. Гликопротеин – единственный вирусный белок, расположенный на поверхности вириона. Он обеспечивает связывание с рецепторами клетки-хозяина, индуцирует эндоцитоз, а также взаимодействуют с M-белком, облегчая морфогенез вирионов. L-белок выполняет функции, необходимые для транскрипции и репликации генома [10].

Постэкспозиционная профилактика может обеспечить практически полное излечение от болезни при своевременном и правильном применении и доступна уже более века. Тем не менее, данное заболевание по-прежнему ежегодно приводит к гибели десятков тысяч людей и животных из-за плохой доступности соответствующих биологических препаратов, особенно в развивающихся странах тропической Азии и Африки [2]. Как и при любом инфекционном заболевании, эффективные программы борьбы с бешенством

avvb_2021_03.indd 20 06.09.2021 7:52:19

опираются на строгий лабораторный надзор, надежные диагностические инструменты и высокоэффективные биологические препараты, в том числе антирабические вакцины [4].

В процессе производства антирабических вакцин вируссодержащее сырье исследуют для определения концентрации такого иммуногенного компонента, как рибонуклеопротеина вируса бешенства [2, 11]. В настоящее время для этих целей применяют прямой сэндвич-вариант иммуноферментного анализа (ИФА) [5]. Однако он может иметь ряд недостатков: возможности увеличения чувствительности метода ограничиваются фоном анализируемого соединения, субстратной специфичностью фермента и аффинностью антител; наличие в тестируемых образцах кофакторов, ингибиторов и стимуляторов активности ферментов; ИФА не позволяет разделять нативные белки и их биологические неактивные фрагменты, сохранившие антигенные детерминанты; возможное изменение каталитической активности фермента при его конъюгировании с антигеном [3].

В связи с этим целесообразно разработать способ опосредованного определения концентрации рибонуклеопротеина вируса бешенства в сырье для вакцин с применением метода амплификации и гибридизационно-флуоресцентной детекции ампликонов.

Данный метод позволяет опосредованно определять концентрацию рибонуклеопротеина в течение 3–4 часов, не предполагает контаминации исследуемых образцов, предполагает удаление кофакторов и ингибиторов реакции амплификации, характеризуется отсутствием изменения каталитической активности фермента, имеет высокую аналитическую чувствительность и специфичность.

В настоящее время представленный метод применяют только для качественного анализа вируссодержащего материала на наличие генома вируса бешенства [13, 14]. Для определения концентрации рибонуклеопротеина вируса бешенства в сырье для вакцин ранее данный метод не применялся.

Цель исследования заключалась в разработке и апробировании способа опосредованного определения концентрации рибонуклеопротеина вируса бешенства в сырье для вакцин с применением метода амплификации и гибридизационно-флуоресцентной детекции ампликонов.

Материалы и методы

Получение очищенного препарата рибонуклеопротеина вируса бешенства. Суспензионные клетки почки новорожденного сирийского хомячка ВНК-21 с концентрацией 4,0 млн кл./мл инфицировали вирусом бешенства штамма РВ-97 в дозе 0,1 ККИД50/мл и инкубировали при температуре 37±0,5 °С до получения 95–100 % поражения клеток в течение 48 ч. Полученную суспензию вируса бешенства подвергали центрифугированию при 1500 g в течение 10 мин и получали осажденные клетки, в которых содержится рибонуклеопротеин. Инфицированные клетки подвергали лизированию, добавляя ледяной раствор апротинина с концентрацией активного вещества 25 мкл/мл. Суспензию инкубировали в течение 1 ч при температуре 4,0±0,5 °С и осветляли центрифугированием при 1 000 g при той же температуре в течение 20 минут. Супернатант собирали, и процедуру повторяли дважды. Полученные надосадки из каждого раунда смешивали и центрифугировали при 12 000 g и температуре 4,0±0,5 °С в течение 8 минут. Супернатант собирали в другую пробирку.

Суспензию рибонуклеопротеина очищали ультрацентрифугированием в ступенчатом градиенте хлорида цезия (CsCl) с концентрациями 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26 % в соответствии с протоколом, описанным Dietzschold [7]. Центрифугирование проводили при 65 000 g в течение 2 ч и температуре 15 °С. Опалесцирующий слой RNP-комплекса вируса бешенства в области 19–21 % хлористого цезия (соответствует плавучей плотности рибонуклеопротеина) отбирали в отдельный флакон. Полученный раствор вносили в центрифужные пробирки, доливали объем пробирок с помощью фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ). Для очищения от остатков хлористого цезия суспензию рибонуклеопротеина осаждали с помощью центрифугирования при 60 000 g в течение 1 ч при 15 °С. Полученный осадок ресуспендировали в 5 мл ФСБ.

avvb_2021_03.indd 21 06.09.2021 7:52:19

Определение концентрации рибонуклеопротеина вируса бешенства в прямом количественном сэндвич-варианте ИФА. Для определения концентрации (в мкг/мл) рибонуклеопротеина вируса бешенства применяли твердофазный прямой сэндвич-вариант ИФА в соответствии с рекомендациями автора [5].

Белковый электрофорез проводили в соответствии с общепринятыми рекомендациями [4].

Выделение нуклеиновой кислоты. Экстракцию РНК проводили методом твердофазной экстракции с применением частиц гидроокиси кремния диаметром 250–300 нм, обработанных 4 М раствором гидроксида натрия. Денатурацию белковых составляющих осуществляли с помощью 4 М гуанидинизотиоцианата (ГТЦ). Промывание частиц сорбента от ингибиторов реакции амплификации проводили с использованием 80 %-ного раствора пропанола-2. Для элюции РНК использовали ТЕ-буфер (pH 7,3), свободный от РНКаз и ионов Mg^{2+}.

Обратная транскрипция. В качестве основы для реакции использовали 10х буферный раствор для обратной транскрипции, хлорид магния (2 мМ на реакцию), дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dNTP) (по 0,25 мкл на реакцию), гексамерные олигонуклеотиды произвольного состава (1,25 пМ на реакцию). Для ингибирования РНК-аз в реакционную смесь добавляли РНазин (10 ед./реакцию). В качестве фермента применяли AMV-ревертазу (10 ед./реакцию). Объем вносимого элюата РНК – 2 мкл, общий объем реакционной смеси – 20 мкл. Обратную транскрипцию проводили при температуре 42 °С в течение 15 мин.

Реакция амплификации. Для проведения ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией ДНК-ампликонов составляли реакционную смесь, в состав которой входили гомологичные участку N-гена вакцинных штаммов вируса бешенства олигонуклеотиды: F-RabV-RNP-праймер, R-RabV-RNP-праймер и P-RabV-RNP-FAM/RTQ1-зонд (дизайн представлен в таблице) в концентрации по 5 пМ на реакцию, дезоксирибонуклеозид-трифосфаты – 2 мМ, 5х буферный раствор, диметилсульфооксид (1 %) (для сведения к минимуму неспецифического связывания олигонуклеотидов), хлорид магния – 2 мМ. В качестве катализатора реакции амплификации применяли *Pyrococcus furiosus* Pfu-Plus-ДНК-зависимую ДНК-полимеразу (10 ед.). Элюаты РНК каждого образца добавляли к реакционной смеси по 5 мкл. Итоговый объем смеси для проведения одной реакции составляет 25 мкл. Амплификация включала в себя 3 подэтапа: денатурацию, отжиг олигонуклеотидов, элонгацию. Денатурацию проводят при температуре 94 °С в течение 10 с, отжиг праймеров и зонда – при температуре 53 °С в течение 30 с, элонгацию – при температуре 74 °С в течение 60 с.

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка заключалась в определении средних арифметических значений и достоверности статистической разницы между средними величинами, определенными по разностному методу Стьюдента-Фишера. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p<0,005$. Чувствительность, специфичность и другие валидационные параметры представленной методики определяли в соответствии с международными рекомендациями [1, 15].

Результаты исследований и обсуждение

На первом этапе исследования проводили разработку способа опосредованного определения концентрации рибонуклеопротеина вируса бешенства в сырье для вакцин с применением метода амплификации и гибридизационно-флуоресцентной детекции ампликонов.

Изначально получали положительный контрольный образец для выявления зависимости концентрации рибонуклеопротеина вируса бешенства и порогового цикла амплификации в соответствии с методикой, представленной в разделе «Материалы и методы». В готовой суспензии определяли концентрацию RNP-комплекса вируса бешенства в прямом количественном сэндвич-варианте ИФА [5]. Для оценки степени чистоты положительного контрольного препарата проводили вертикальный белковый электрофорез в полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия. По результатам

avvb_2021_03.indd 22 06.09.2021 7:52:19

исследования концентрация RNP-комплекса составляла 4880 мкг/мл. Результаты вертикального электрофореза отражены на рис. 1, из которого видно, что получен чистый препарат рибонуклеопротеина, включающий в свой состав нуклеопротеин, фосфопротеин и L-белок вируса бешенства с молекулярным весом 57, 260 и 190 kDa, соответственно. В отрицательном контроле данные белки не обнаружены. Из данного препарата с помощью 1/15 М раствора ФСБ приготовили положительный контрольный образец с концентрацией RNP-комплекса 5,0 мкг/мл.

Составляли контрольную панель положительных стандартов рибонуклеопротеина вируса бешенства штамма РВ-97, в качестве которых использовали очищенные препараты с концентрациями RNP-комплекса: 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мкг/мл. В качестве отрицательного контроля применяли суспензию клеток ВНК-21, не зараженную вирусом бешенства.

Из всех стандартных положительных и отрицательного контролей выделяли нуклеиновую кислоту. Для этого применяли метод твердофазной экстракции с применением частиц гидроокиси кремния диаметром 250–300 нм, обработанных 4 М раствором гидроксидом натрия. Принцип очистки РНК вируса бешенства с помощью гидроокиси кремния базируется на высокой степени аффинности отрицательно заряженного остова РНК к положительно заряженным частицам сорбента. Фосфатные группы при физиологическом pH отрицательно заряжены, поэтому РНК является полианионом и может взаимодействовать с гидроокисью кремния. Катионы натрия на поверхности частиц сорбента выступают в качестве «мостика», который притягивает анионы кислорода в составе остатка фосфорной кислоты РНК. При высоком значении ионной силы (pH 5,0–5,5) происходит разрушение водородных связей между протоном воды и отрицательно заряженными ионами кислорода в частицах сорбента. В результате молекулы нуклеиновых кислот связываются с носителем, а интенсивное промывание позволяет удалить все ингибиторы реакции амплификации [14]. Элюирование РНК проводили с применением ТЕ-буфера.

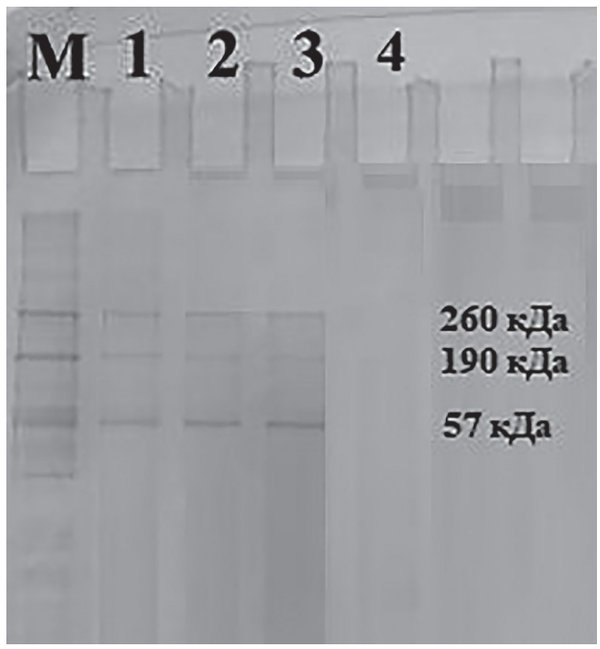


Рис. 1. Электрофореграмма очищенного RNP-комплекса вируса бешенства (М – маркер, 1, 2, 3 – образец препаратов рибонуклеопротеина вируса бешенства, исследовали в трех повторностях, 4 – отрицательный контроль).

Полученные элюаты РНК, выделенных из контрольных образцов с разной концентрацией рибонуклеопротеина использовали для проведения обратной транскрипции и реакции амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией ДНК-ампликонов. Постановку реакций осуществляли при температурных и временных параметрах, сведения о которых представлены в разделе «Материалы и методы». Для ПЦР применяли *Pyrococcus furiosus* Pfu-Plus-ДНК-зависимую ДНК-полимеразу, поскольку она является термостабильным рекомбинантным ферментом. Фермент осуществляет синтез ДНК в направлении 5'->3' в присутствии ионов Mg^{2+} и при соответствующем значении pH, а также обладает 3'->5'-экзонуклеазной активностью («проверочной активностью» – «*proofreading activity*»). Наличие 3'->5'- экзонуклеазной активности делает фермент пригодным для реакции амплификации, где необходимо получение продукта с высокой точностью синтеза. При работе в оптимальных условиях Pfu-plus-ДНК-полимераза допускает минимальное количество ошибок по сравнения с другими термостабильными полимеразами.

avvb_2021_03.indd 23 06.09.2021 7:52:19

Таблица 1

Дизайн оригинальных олигонуклеотидов для амплификации кДНК вируса бешенства при определении концентрации рибонуклеопротеина в сырье для антирабических вакцин

Наименование олигонуклеотидов	Дизайн олигонуклеотидов (5'…3')	Позиции в геноме, н.о.	Размер фрагмента, п.н.
F-RabV-RNP-праймер	ACTCTAATGACAACTCACAA	626…645	444
R-RabV-RNP-праймер	ACATGCGGCAATAACTGT	1052…1069	
P-RabV-RNP-FAM/RTQ1-зонд	FAM-TTGGAGTACTATACCGAA-RTQ1	658…675	

В качестве гомологичных участку N-гена вируса бешенства для проведения реакции амплификации использовали следующие олигонуклеотиды: F-RabV-RNP-праймер, R-RabV-RNP-праймер и P-RabV-RNP-FAM/RTQ1-зонд, дизайн которых представлен в таблице. Олигонуклеотиды подбирали в соответствии с рядом общих правил, которые отражены в работе B. Deiman [6]. Длины F-RabV-RNP-праймера, R-RabV-RNP-праймера и P-RabV-RNP-FAM/RTQ1-зонда составляют 20, 18 и 18 н.о., что соответствует требованиям (18–30 н.о.) [6]. Нуклеотидная последовательность зонда не комплементарна олигонуклеотидным праймерам. Отсутствуют 4 и более подряд одинаковых нуклеотидов в цепи праймеров и зонда. Флуорофор FAM присоединен к 5'-концу, а гаситель флуоресценции RHQ1 – к 3'-концу. В качестве флуоресцентного красителя был выбран FAM с длиной волны максимальной флуоресценцией 520 нм. Для тушения свечения использовали гаситель флуоресценции RHQ1 с длиной волны максимального поглощения при 520 нм и возможном диапазоне гашения 470-570 нм. Иными словами, была выбрана подходящая пара «флуорофор-гаситель». Размер амплифицируемого продукта составляет 444 п.н.

При анализе нуклеотидных последовательностей олигонуклеотидов установили, что для праймеров и зонда нехарактерно образование «шпилек», 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.

Экспериментально температуру отжига определяли по кривым плавления гетеродимера олигонуклеотида и матрицы с помощью модели фолдинга с использованием программного обеспечения Hybrid. В результате проведения эксперимента было выявлено, что температура отжига рассматриваемых олигонуклеотидов составляет 52, 53, 55 °C. Для проведения реакции амплификации было решено проводить гибридизацию праймеров и зонда с участком N-гена вируса бешенства при температуре 53 °C.

Последовательности оригинальных олигонуклеотидов проверили на наличие нежелательных совпадений с другими последовательностями нуклеиновых кислот с использованием Банка данных последовательности нуклеиновых кислот вируса бешенства [8]. Последовательности праймеров и зонда также проанализировали на наличие внутренних вторичных структур с помощью программы сворачивания нуклеиновых кислот с помощью программы Mfold. Выявлено, что для разработанных олигонуклеотидов нежелательных совпадений с другими последовательностями нуклеиновых кислот, а также наличия внутренних вторичных структур не обнаружено.

Результаты реакции амплификации анализировали, оценивая и сравнивая графики накопления флуоресцентного сигнала по значениям пороговых циклов амплификации C_t, определенных с помощью пересечения пороговой линии и логистической функции вида $Fl = f(C_t)$ методом гибридизационно-флуоресцентной детекции ДНК-ампликонов. Учет результатов реакции производили на каждом цикле. Детектирующий амплификатор определял уровень флуоресценции и строил кинетическую кривую в координатах: уровень флуоресценции – цикл реакции ам-

avvb_2021_03.indd 24 06.09.2021 7:52:19

плификации. Для положительных контрольных образцов были сформированы логистические графики, полученные при анализе флуоресценции красителя FAM, входящего в состав молекулярного зонда. Для отрицательного контрольного образца график не выходил за пределы пороговой линии и не имел экспоненциальной зависимости.

Устанавливали зависимость между пороговым циклом амплификации и концентрацией RNP-комплекса вируса бешенства в сырье для антирабической вакцины. Полученные данные отражены на рисунке 2 и выражены в виде функции: $C_{RNP\ ВБ} = -0{,}3002 \times C_t + 8{,}81$, где $C_{RNP\ ВБ}$ – концентрация рибонуклеопротеина вируса бешенства, C_t – пороговый цикл амплификации. Оценивали величину эффективности реакции амплификации (E) по формуле: $E=(10^{-1/k}-1)$ (k брали из функции $C_t = -3{,}3263 \times CRNP\ ВБ + 29{,}38$) (рисунок 3), а также достоверность аппроксимации (R^2). Эффективность реакции амплификации составила 99,83 %, достоверность аппроксимации – 0,9984, что соответствовало общепринятым требованиям, предъявляемым к молекулярно-биологическим тест-системам [15].

На следующем этапе исследования проводили апробирование разработанного способа и определили степень его достоверности. Для анализа использовали 304 суспензии культурального вируса бешенства производственных штаммов РВ-97 и ВНИИЗЖ со следующими концентрациями RNP-комплекса: 2,0–5,0 мкг/мл (76 образцов), 0,5–2,0 мкг/мл (76 образцов), 0,1–0,5 мкг/мл (76 образцов), 0,01–0,10 мкг/мл (76 образцов). В качестве положительного контроля применяли суспензию культурального вируса бешенства штамма РВ-97 с концентрацией рибонуклеопротеина 1,0 мкг/мл. В качестве отрицательного контроля применяли суспензию клеток ВНК-21, не зараженную вирусом бешенства.

Испытуемые пробы и контрольные образцы исследовали в трех повторностях. Элюирование нуклеиновой кислоты, проведение обратной транскрипции и реакции амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией ампликонов проводили, как указано выше. Данные, полученные с помощью разработанного способа, коррелировали

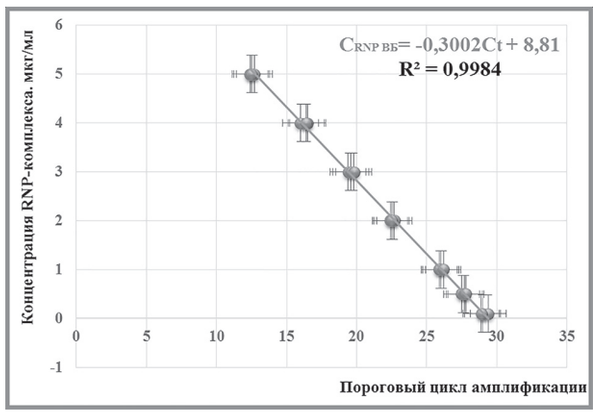


Рис. 2. Зависимость концентрации рибонуклеопротеина вируса бешенства и величины порогового цикла амплификации (n=3, отмечены точки, отображающие средние значения пороговых циклов реакции амплификации).

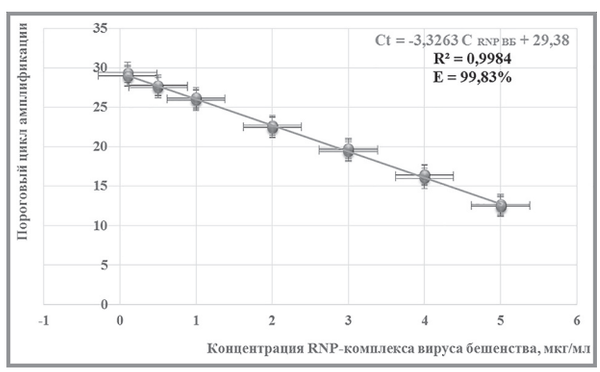


Рис. 3. Зависимость величины порогового цикла амплификации от концентрации RNP-комплекса вируса бешенства (n=3, отмечены точки, отображающие средние значения пороговых циклов реакции амплификации).

с методом прямого количественного варианта ИФА на 97,2–100,0% для 2,00–5,00 мкг/мл (n=76), на 96,7–97,2% для 2,00–0,50 мкг/мл (n=76), на 95,9–96,7% для 0,10–0,50 мкг/мл (n=76), на 94,3–95,6% для 0,10–0,01 мкг/мл (n=76). Полученные результаты свидетельствовали о высокой степени точности разработанного способа по сравнению с методом ИФА.

Проводили определение аналитической чувствительности метода определения концентрации иммуногенного RNP-комплекса вируса бешенства в сырье для антирабических вакцин методом амплификации и гибридизационно-флуоресцентной детекции ДНК-ампликонов. Для определения аналитической чувствительности подготавливали панель положительных стандартов вируса бешенства со следующими концентрациями

avvb_2021_03.indd 25 06.09.2021 7:52:19

рибонуклеопротеина вируса бешенства: 0,0001; 0,001; 0,005; 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 мкг/мл. Испытуемые контрольные образцы исследовали в 7 повторностях. Все этапы работы осуществляли, как описано выше. Проведен сравнительный анализ концентраций RNP-комплекса вируса бешенства с помощью разработанного способа в сравнении с данными прямого количественного сэндвич-варианта ИФА. Выявлено, что аналитическая чувствительность метода составила 0,001 мкг/мл (10 нг/мл).

Для определения чувствительности разработанного теста исследовали 386 образцов суспензий, которые являлись заведомо положительными по данным исследования в ИФА. Постановку теста проводили, как отражено выше. В результате анализа с помощью разработанного способа определили, что количество достоверно положительных – 384, а ложноотрицательных – 2. Таким образом, чувствительность теста составила 99,48 %.

Для исследования специфичности метода тестировали 384 образцов суспензий, которые являлись отрицательными по данным исследования в ИФА. В результате исследования разработанным способом определили, что количество достоверно отрицательных – 384. Таким образом, специфичность разработанного теста составила 100,00 %. Учитывая полученные данные, рассчитали общую точность метода, которая соответствовала 99,74 %.

Для определения прецизионности представленного способа в условиях воспроизводимости суспензии вируса бешенства исследовали два оператора в разное время в 20 повторностях. Для генеральной совокупности значений Ct размах вариации составил 0,05–0,39, среднее линейное отклонение находилось в диапазоне 0,007–0,048, т. е. степень колеблемости в выборках относительно среднего уровня признака низкая. Дисперсия составила 0,001–0,005, среднее квадратичное отклонение — 0,010–0,086, что подтверждает незначительную степень отклонений индивидуальных значений C_t от среднего арифметического и высокий уровень достоверности данных внутри каждой выборки. Коэффициент осцилляции составил 0,361–2,207 %, линейный коэффициент вариации – 0,041–0,169 %, коэффициент вариации – 0,044–0,169 %, что соответствует общепринятым нормам (Cδ<3%) [1, 15]. Таким образом, по показателям вариации разработанный способ удовлетворял критериям приемлемости.

Заключение

Предложен новый подход к опосредованному определению концентрации рибонуклеопротеина вируса бешенства в сырье для вакцин с применением метода амплификации и гибридизационно-флуоресцентной детекции ампликонов, который позволяет сократить время исследования до 3–4 ч; исключить вероятность контаминации; увеличить чувствительность и специфичность за счет применения высокоспецифичных оригинальных олигонуклеотидов.

Выявлено, что между концентрацией рибонуклеопротеина вируса бешенства и пороговым циклом амплификации установлена зависимость $C_{RNP\ ВБ} = -0{,}3002 \times C_t + 8{,}81$, отраженная в виде линейной функции с высокими достоверностью аппроксимации ($R^2 = 0{,}9984$) и эффективностью амплификации 99,83 %. Разработанная математическая модель дает возможность опосредованно определять концентрацию RNP-комплекса вируса бешенства в сырье для производства антирабических вакцин.

Определено, что аналитическая чувствительность метода составила 10 нг/мл, чувствительность способа – 99,48 % (n=386), специфичность – 100,00 % (n=386), общая точность – 99,74 % (n=386). Проведено исследование прецизионности представленного способа в условиях воспроизводимости и определены незначительная степень отклонений индивидуальных значений порогового цикла амплификации 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. Подтверждена высокая степень прецизионности в условиях воспроизводимости, что позво-

avvb_2021_03.indd 26 06.09.2021 7:52:19

ляет применять разработанный способ для опосредованного определения концентрации рибонуклеопротеина вируса бешенства в сырье для вакцин.

Список литературы

1. Васильева, Л. А. Статистические методы в биологии, медицине и сельском хозяйстве: учеб. пособие / Л. А. Васильева. Новосибирск.: Институт цитологии и генетики СО РАН, 2007. 124 с.

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

3. Масяго А. В. Некоторые ошибки при постановке ИФА. / А. В. Масяго. Кольцово, 2002. 31 с.

4. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. / Л. А. Остерман. М.: МЦНМО, 2002, 248 с.

5. Сухарьков А. Ю. Разработка методов оценки оральной антирабической вакцинации животных: автореферат дис. ... к. б. н.: 03.02.02 / А. Ю. Сухарьков. Владимир, 2014. 25 с.

6. Deiman B. Characteristics and applications of nucleic acid sequence based amplification / B. Deiman, P. van Aarle, P. Sillekens // Mol. Biotech. 2002. Vol. 20. P. 163–179.

7. Dietzschold B. Induction of protective immunity against rabies by immunization with rabies virus ribonucleoprotein / B. Dietzschold, H. H. Wang, C. E. Rupprecht, E. Celis, M. Tollis, E. Heber-Katz, H. Koprowski // Proc. Natl. Acad Sci USA. 1987. V. 84. P. 9165–9169.

8. GenBank. [Электронный ресурс] / URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov. (Дата обращения: 02.02.2021).

9. Horton D. L. Quantifying antigen relationsships among the lyssaviruses. / D. L. Horton, L. M. McElhinney // J. Virol. 2010. V. 84. P. 11841–11848.

10. Levin S. N. Infections of the nervous system / S. N. Levin, J. L. Lyons // Am J. Med. 2018. V. 131. P. 25–32.

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

12. Okumura A. Rabies virus assembly and budding Adv / A. Okumura, R. N. Harty // Virus Res. 2011. V. 79. P. 23–32.

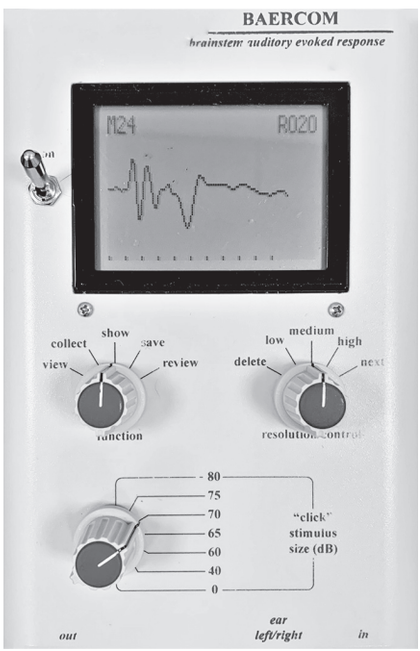
13. Schnee M. An mRNA Vaccine Encoding Rabies Virus Glycoprotein Induces Protection against Lethal Infection in Mice and Correlates of Protection in Adult and Newborn Pigs / M. Schnee, A. B. Vogel // PLoS Negl Trop Dis. 2016 Jun 23;10(6):e0004746. doi: 10.1371/journal.pntd.0004746.

14. Okumura A., Harty R.N. Rabies virus assembly and budding Adv // Virus Res. – 2011. – V. 79. – P. 23-32.

15. PCR. Methods and Protocols / ed. L. Dominques. 2017. 283 p. DOI 10.1007/978-1-4939-7060-5.

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

Объективная проверка слуха у животных. BAER-тест



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

Подробнее: http://invetbio.spb.ru/seminar_baer.htm

Записаться на курс, приобрести прибор для проверки слуха у животных: ivb-info@mail.ru

avvb_2021_03.indd 27 06.09.2021 7:52:19

DOI 10.24412/2074-5036-2021-3-28-31
УДК 619:616.99:636.2 (571.61)
Ключевые слова: гельминты, крупный рогатый скот, моноинвазии, ассоциации гельминтов, Амурская область.
Key words: helminths, cattle, monoinvasions, helminth associations, Amur region.

Бондаренко Г. А., Соловьева И. А., Трухина Т. И., Иванов Д. А.

ПАРАЗИТОЦЕНОЗЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА АМУРСКОЙ ОБЛАСТИ
PARASITOCENOSES OF CATTLE OF THE AMUR REGION

ФГБНУ Дальневосточный зональный научно-исследовательский ветеринарный институт
Адрес: 675005, Россия, Амурская область, г. Благовещенск, ул. Северная, д.112
Federal State Budgetary Scientific Institution Far East Zone Research Veterinary Institute
Address: Amur region, Blagoveshchensk, st. Severnaya, 112

Бондаренко Галина Анатольевна, научный сотрудник,e-mail: galy78@yandex.ru
Bondarenko Galina Anatolyevna, Researcher, e-mail:galy78@yandex.ru
Соловьева Ирина Александровна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник,
e-mail: sia_storm@ mail.ru
Solovyeva Irina Alexandrovna, PhD of Biology, Leading Researcher, e-mail: sia_storm@ mail.ru
Трухина Тамара Ивановна, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник,
e-mail: toma.trukhina@mail.ru
Trukhina Tamara Ivanovna, PhD of Agriculture, Senior Researcher, e-mail: toma.trukhina@mail.ru
Иванов Денис Александрович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,
e-mail: iva-denis@mail.ru
Ivanov Denis Alexandrovich, PhD of Biology, Senior Researcher, e-mail: iva-denis@mail.ru

Аннотация. Для установления формы паразитарного заражения исследовали фекалии от крупного рогатого скота, отобранные в разных хозяйствах Амурской области. Установлено заражение в форме моноинвазий в 70,3 % случаев гельминтозов и в форме микстинвазий в 29,7 %. В случаях моноинвазии определены 7 нозологических паразитарных единиц. Микстинвазии представлены в сочетании двух видов гельминтов в 68,2 % случаев ассоциативных гельминтозов, ассоциации, состоящие из трех видов гельминтов, – до 28,8 % и ассоциации из четырех видов – до 3,0 % выявленных ассоциативных гельминтозов. Рекомендовано постоянное наблюдение за паразитарными инвазиями, выявленными в хозяйствах Амурской области с установлением формирующихся паразитоценозов для своевременной коррекции лечебно-профилактических мероприятий.

Summary. *To establish the form of parasitic infection, feces from cattle sampled from different farms of the Amur Region were examined. Infection was established in the form of monoinvasions in 70.3 % of cases of helminthiasis and in the form of miyxinvasions in 29.7 %. In cases of monoinvasion, 7 nosological parasitic units were identified. Mixinvasions are presented in a combination of two viewes of helminths in 68.2 % of cases of associative helminthiases, associations consisting of three viewes of helminths – up to 28.8 % and associations of four viewes – up to 3.0 % of identified associative helminthiases. It is recommended to constantly monitor parasitic infections detected in the farms of the Amur Region with the establishment of emerging parasitocenoses for the timely correction of therapeutic and prophylactic measures.*

Введение

Для продуктивного животноводства важное значение имеет защита сельскохозяйственных животных от заболеваний, в том числе гельминтозов. Известно, что при заражении гельминтами снижается продуктивность, у коров снижаются надои молока, у молодняка замедляется прирост массы тела, ухудшается качество полученного мяса [4, 9]. В литературных источниках имеются данные, что у части инвазированых животных встречаются ассоциации гельминтов. В разных хозяйствах и регионах формируются гельминтозы в различных сочетаниях и имеют разные показатели зараженности. Для успешной борьбы с гельминтозами у животных необходимы более подробные сведения о смешанных гельминтозах и их сочетаниях в условиях конкретного региона. В связи с этим целью нашей работы было изучение паразитоценозов у крупного рогатого скота в условиях Амурской области.

Методы исследования

Для определения заражения гельминтами проводили исследование фекалий от крупно-

avvb_2021_03.indd 28 06.09.2021 7:52:20

го рогатого скота Амурской области на наличие в них яиц и личинок гельминтов седиментационными методами (формалин-эфирный, уксусно-эфирный), согласно МУК 4.1.3145-13 «Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы» [7]. Для обнаружения личинок легочных и кишечных нематод использовали метод культивирования личинок и метод Бермана. Идентификация яиц и личинок гельминтов проводилась по атласу Черепанова А. А., Москвина А. С. и др., 1999 [10] и определителю Ивашкина В. М., Мухамадиева С. А., 1981 [6]. Статистическая обработка полученных данных проведена методами вариационной статистики с использованием стандартных компьютерных программ [8].

Результаты

Для изучения встречающихся форм паразитоценозов (моноинвазия, миктсинвазия) в организме крупного рогатого скота в условиях Амурской области был исследован материал, полученный за период 2016–2020 гг. от 325 голов крупного рогатого скота пяти скотоводческих хозяйств Амурской области. В результате исследований было выявлено 222 инвазированных гельминтами животных, что составило 68 % от общего числа обследованных (Таблица 1). При этом моноинвазии в разных хозяйствах Амурской области составили от 44,4 % до 74,2 %, микстинвазии (смешанные) от 25,8 % до 55,6 % (Таблица 1, Рисунок 1).

Моноинвазия преимущественно представлена цестодами рода *Moniezia sp*. (67,9 %) и нематодами вида *Strongylloides papillosus* (19,2 %), на остальные виды гельминтов приходится от 0,6 % до 3,8 % заражений (*Neoascaris vitulorum, Setaria labiatopapillosa, Strongylata, Oesophagostomum sp.* и *Trichostrongylus sp.*) (Ррисунок 2).

На смешанные инвазии, включающие в себя ассоциацию двух видов гельминтов, приходится до 68,2 % всех случаев; на ассоциации, состоящие из трех видов гельминтов – до 28,8 %, из четырех видов – до 3,0 % (Рисунок 3). Анализ ассоциаций гельминтозов при смешанной инвазии показал, что в 75,8 % случаев выявляется сочетание двух видов, один из

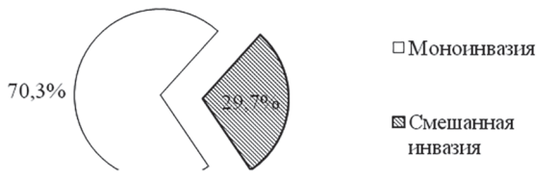


Рис. 1. Соотношение моноинвазии к смешанным инвазиям.

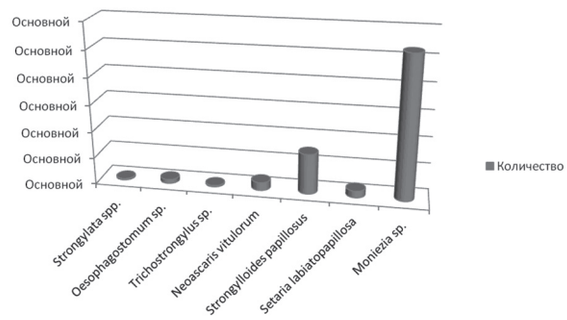


Рис. 2. Соотношение заражений гельминтами крупного рогатого скота в моноинвазиях.

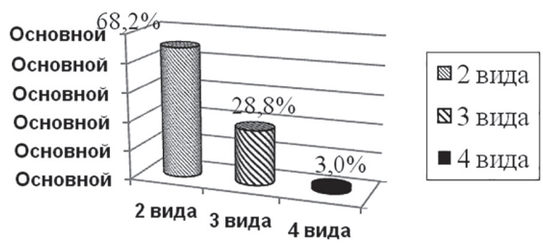


Рис. 3. Соотношение количества видов гельминтов в смешанных инвазиях.

которых нематодоз (с преобладанием таких видов, как *Strongylata , N. vitulorum, Strongylloides papillosus*) и цестодоз (цестоды рода *Moniezia sp.*). В 15,2 % случаев смешанной инвазии были выявлены сочетания двух различных видов нематод. По 4,5 % случаев приходится на сочетание (нематоды + трематоды + цестоды) и (трематоды + цестоды) соответственно.

Обсуждение результатов

По результатам проведенных исследований установлено, что в хозяйствах Амурской области микстинвазии (смешанные) составили 29,7 % всех случаев заражения, похожие данные получены Байсаровой З. Т., Айсхановым С. Т. (2017) [1]. Исследованиями других авторов установлены другие данные по ассоциативным гельминтозам, так наиболее благополучными оказались хозяйства в Акмолинской области 17,1 %, с 2-мя

avvb_2021_03.indd 29 06.09.2021 7:52:20

Таблица 1

Показатели зараженности гельминтами КРС в Амурской области

Показатели	ЗАО (нп) агрофирма «Партизан»		ООО «Амурский партизан»		ООО «Колхоз Томичевский»		ООО «Приамурье»		ООО «Красная звезда»		Всего:	
	голов	ЭИ, %	голов	ЭИ, %	голов	ЭИ, %	голов	ЭИ, %	голов	ЭИ, %	голов	ЭИ, %
Исследовано	95	65,3	165	69,1	44	63,6	9	100	12	75	325	68
Выявлено инвазированных	62		114		28		9		9		222	
Нематоды	42	67,7	53	46,5	25	89,3	5	55,6	9	100	134	60,4
Трематоды	4	6,5	6	5,3	0	-	0	-	0	-	10	4,5
Цестоды	40	64,5	106	92,3	7	25,0	9	100	0	-	162	73,0
Моноинвазия	46	74,2	80	70,2	20	71,4	4	44,4	6	66,7	156	70,3
Смешанная инвазия	16	25,8	34	29,8	8	28,6	5	55,6	3	33,3	66	29,7

представленными видами – нематодами рода *Ostertagia* и простейшими из рода *Eimeria* Багадат А., Бисенгалиев Р. М. (2019) [2]. По данным Шихалиева М. А. с соавт. (2014), Субботина А. М. (2012), Горовенко М. В., Медведская Т. В. (2016), Малюнкина Я. С. с соавт. (2018) [3, 8, 11, 12] заражение крупного рогатого скота сразу несколькими видами гельминтов встречается в более чем 50 % случаев всех выявленных гельминтозов.

По встречающимся ассоциациям на территории Амурской области преобладают различные сочетания 2-х видов гельминтов в 75,8 % случаев, сочетание из 3-х видов встречается в 4,5 % случаев, также выявлены единичные случаи сочетания 4-х видов гельминтов. По данным, полученными другими авторами Субботин А. М. (2012), Горовенко М. В., Медведская Т. В., (2016), Малюнкина Я. С. с соавт. (2018) [3, 8, 11] сочетания ассоциаций из 2-х видов встречается от 19,5 % до 40,7 % всех выявленных ассоциаций, что меньше в более чем 2–3 раза полученных нами данных по выявленным ассоциациям гельминтов. Также следует отметить, что имеются данные сочетаний ассоциативных гельминтозов, состоящих сразу из 5 видов гельминтов, а в условиях Северного Кавказа до 15 видов гельминтов Шахалиева М. А. с соавт. (2014) [12]. В условиях Амурской области таких многообразных сочетаний гельминтозов у крупного рогатого скота не выявлено.

Выводы

В условиях Амурской области установлено заражение микстинвазиями в 29,7 %, моноинвазиями – в 70,3 % случаев выявленных гельминтозов. Встречаются ассоциации в сочетании от 2-х до 4-х видов гельминтов, в большинстве случаев 75,8 % ассоциаций, состоящих из 2-х видов гельминтов. Существуют видимые отличия как в количестве сочетаний разных видов гельминтов, так и соотношений таких ассоциаций к общему количеству зараженных гельминтами животных в зависимости от региона, в связи с чем существует необходимость постоянного наблюдения за формированием определенных сочетаний гельминтозов для своевременного реагирования и определения правильной тактики лечебно-профилактических мероприятий.

Список литературы

1. Байсарова З. Т. Структура популяции отдельных видов гельминтов при смешанной инвазии у крупного рогатого скота / З. Т. Байсарова, С. Т. Айсханов // Российский паразитологический журнал. 2017. №1 (39). С. 20–22. doi: 10.17513/np.255

2. Багадат А. Ассоциации стронгилят и эймерий кишечного тракта крупного рогатого скота в Акмолинской области (Казахстан) / А. Багадат, Р. М. Бисенгалиев // Актуальные проблемы и перспективы развития агропромышленного комплекса: российский и зарубежный опыт: Сборник материалов Международной научно-практической конференции. 2019. С. 13–15.

3. Горовенко М. В. Экологические аспекты профилактики гельминтозов крупного рогатого

avvb_2021_03.indd 30 06.09.2021 7:52:20

скота республики Беларусь / М. В. Горовенко, Т. В. Медведская // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы: Сборник научных трудов. Гродно, 2016. С. 28–35.

4. Иванюк В. П. Ветеринарно-санитарная экспертиза продуктов убоя крупного рогатого скота при гельминтозах / В. П. Иванюк, Г. Н. Бобкова, Е. А. Кривопушкина // Актуальные проблемы ветеринарии и интенсивного животноводства: Материалы национальной научно-практической конференции, посвященной 82-летию со дня рождения Заслуженного работника высшей школы РФ, Почётного профессора Брянской ГСХА, доктора ветеринарных наук, профессора Ткачева Анатолия Алексеевича. 2020. С. 45–49.

5. Ивашкин В. М. Определитель гельминтов крупного рогатого скота / В. М. Ивашкин, С. А. Мухамадиев. М.: Наука, 1981. 259 с.

6. Лабораторная диагностика гельминтов и протозоозов: Методические указания МУК 4.2.3145-13, 2-е изд., испр. и доп., ил. М.: ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора, 2014. 118 с.

7. Лакин Г. Ф. Биометрия: [Учеб. пособие для биол. спец. вузов]. – 4-е изд., перераб. и доп. / Г. Ф. Лакин. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.

8. Малюнкина Я. С. Гельминтофауна крупного рогатого скота в Ханты-Мансийском автономном округе – Югра / Я. С. Малюнкина, О. А. Столбова, Л. Н. Скосырских // АгроЭкоИнфо. 2018. № 4. С. 37.

9. Сафиуллин Р. Т.Ущерб от смешанной инвазии коров и молодняка крупного рогатого скота, вызванной фасциолами и стронгилятами пищеварительного тракта / Р. Т. Сафиуллин, К. А. Хромов // Российский паразитологический журнал. 2009. № 2. С. 81–85.

10. Черепанов А. А. Дифференциальная диагностика гельминтозов по морфологической структуре яиц и личинок возбудителей. / А. А. Черепанов, А. С. Москвин, Г. А. Котельников, В. М. Хренов. М., 1999. 76 с.

11. Субботин А. М. Гельминты как основной компонент паразитарной системы животных / А. М. Субботин // Ученые записки учреждения образования Витебская ордена Знак почета государственная академия ветеринарной медицины. 2012. Т. 48. № 1. С. 203–206.

12. Шихалиева М. А. Численность и ассоциации паразитов у крупного рогатого скота и коз в регионе Северного Кавказа / М. А. Шихалиева, М. И. Биттирова, С. Ш. Мантаева, З. Х. Юсупова, С. Ш. Чилаев // Российский паразитологический журнал. 2014. № 4. С. 16–21.

DOI: 10.24412/2074-5036-2021-3-31-36
УДК: 616.99:591.2:599.735.52
Ключевые слова: алтайский горный баран, сибирский горный козел, эндопаразитофауна, кокцидии, нематоды
Key words: Altai argali, Siberian ibex, endoparasite fauna, coccidia, nematodes

[1]Логинова О. А., [2]Белова Л. М., [2]Чупрак Д. И.

ЭНДОПАРАЗИТАРНЫЙ ПРОФИЛЬ АЛТАЙСКИХ ГОРНЫХ БАРАНОВ (*OVIS AMMON AMMON*) И СИБИРСКИХ ГОРНЫХ КОЗЛОВ (*CAPRA SIBIRICA*) ХРЕБТА ЧИХАЧЕВА (КОШ-АГАЧСКИЙ РАЙОН, РЕСПУБЛИКА АЛТАЙ)

ENDOPARASITIC PROFILE OF ALTAI ARGALI (OVIS AMMON AMMON) AND SIBERIAN IBEX (CAPRA SIBIRICA)OF THE CHIKHACHEV MOUNTAIN RANGE (KOSH-AGACH DISTRICT, ALTAI REPUBLIC)

[1]ФГБУН «Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН»
Адрес: 119071, Россия, Москва, Ленинский пр., д. 33
A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, RAS
Address: 119071, Russia, Moscow, 33 Leninsky Prospect

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

avvb_2021_03.indd 31 06.09.2021 7:52:20

ПАРАЗИТОЛОГИЯ

Логинова Ольга Александровна, канд. вет. наук, и. о. научного сотрудника Лаборатории систематики и эволюции паразитов Центра паразитологии. E-mail: loginova_spb@bk.ru.
Loginova Olga Aleksandrovna, PhD of Veterinary Science, Acting Researcher of Laboratory of Parasite Systematics and Evolution of the Center for Parasitology. E-mail: loginova_spb@bk.ru
Белова Лариса Михайловна, доктор биол. наук, заведующая кафедрой паразитологии им. В. Л. Якимова. E-mail: larissabelova2010@yandex.ru
Belova Larisa Mikhailovna, Doctor of Biology Science, Head of the Dept. of Parasitology, St. Petersburg State University of Veterinary Medicine. E-mail: larissabelova2010@yandex.ru
Чупрак Дарья Игоревна, аспирант кафедры паразитологии им. В. Л. Якимова. E-mail: darya.chuprak@mail.ru
Chuprak Daria Igorevna, PhD student of the Dept. of Parasitology. E-mail: darya.chuprak@mail.ru

Аннотация. В 2019–2020 годах во время добровольческих экспедиций «По следам снежного барса», проходивших на хребте Чихачева Кош-Агачского района Республики Алтай, были собраны фекалии алтайских горных баранов (*Ovis ammon ammon*) и сибирских горных козлов (*Capra sibirica*). Свежие образцы предварительно исследовали в полевых условиях гельминтоскопическим методом, а также по методу Вайда с помощью биологического микроскопа С-11 (Micromed, КНР). Материал в количестве 12 проб доставили в Лабораторию по изучению паразитарных болезней на базе кафедры паразитологии им. В. Л. Якимова ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины». Лабораторную диагностику проводили по методу: 1) Шильникова; 2) Дарлинга; 3) последовательных промываний. Обнаружили личинок L1 нематод рода *Protostrongylus*, яйца нематод рода *Nematodirella*, яйца нематод желудочно-кишечного тракта отряда *Strongylida* и ооцисты протист рода *Eimeria*. Выявленная фауна характерна и для мелких жвачных, и для изучаемой территории. Мониторинг паразитарной ситуации диких и домашних полорогих животных хребта Чихачева необходимо продолжать.
Summary. *In 2019–2020, during the volunteer expeditions "Following the Footprints of the Snow Leopard", which took place on the Chikhachev mountain range of the Kosh-Agach District of the Altai Republic, faeces of Altai argali (Ovis ammon ammon) and Siberian ibex (Capra sibirica) were collected. Fresh samples were preliminarily examined in the field by the helminthoscopic method, as well as by the Wajda's method using a C-11 biological microscope (Micromed, China). Material in the amount of 12 samples was delivered to the Laboratory for the Study of Parasitic Diseases on the basis of the Department of Parasitology, St. Petersburg State University of Veterinary Medicine. Laboratory diagnostics was carried out according to the following method: 1) Shilnikov's; 2) Darling's; 3) successive washes. We found L1 larvae of nematodes of Protostrongylus sp., eggs of nematodes of Nematodirella sp., eggs of GI nematodes of Strongylida order, and oocysts of Eimeria sp. The identified fauna is typical for both small ruminants and the study area. Monitoring of the parasitic situation of wild and domestic Bovids of the Chikhachev mountain range should be continued.*

Введение

Хребет Чихачева располагается на юго-востоке Алтайских гор и занимает трансграничное положение между российскими республиками Алтай и Тыва, а также сопредельным государством Монголия. Копытная териофауна хребта представлена алтайским горным бараном (син. архар, аргали и др.) и сибирским горным козлом (син. тэк, центральноазиатский каменный козел и др.). Алтайский горный баран – самый крупный представитель своего вида, занесен в Красную книгу Российской Федерации, как находящийся под угрозой исчезновения. Причем на указанной территории обитает порядка 1150 особей, то есть, около ¼ всей численности подвида [6]. Что касается охранного статуса сибирского горного козла, то он оценивается как близкий к уязвимому положению. Кроме того, эти жвачные являются неотъемлемой частью пищевой пирамиды, вершину которой занимает снежный барс (син. ирбис, снежный леопард). Последний занесен в Красную книгу угрожаемых видов Международного союза охраны природы (МСОП) и имеет статус редкого или исчезающего вида во всех 12 странах, где он обитает [7].

На численность алтайских горных баранов и сибирских горных козлов оказывают влияние как природные, так и антропогенные лимитирующие факторы. Одним из таких факторов является подверженность болезням, в том числе паразитарным. На поверхности тела животных могут паразитировать насекомые и клещи (эктопаразиты), а в полостях и тканях – протисты и гельминты (эндопаразиты).

Алтайские горные бараны и сибирские горные козлы ведут мигрирующий образ жизни: зимой большинство животных уходит в Монголию (некоторые просто перебираются из заснеженных гор в малоснежные райо-

avvb_2021_03.indd 32 06.09.2021 7:52:20

ны); летом – возвращаются в Россию. Это позволяет им избегать глубокого снега, сильного мороза и отсутствия пищи. Помимо диких полорогих, в Республике Алтай существуют и домашние. На сегодняшний день основными видами сельскохозяйственных животных там являются козы и овцы. Известно, что родственные хозяева зачастую заражены и родственными паразитами. При этом схема филогенетических отношений между специализированными паразитами, как правило, соответствует схеме филогенетических отношений между их хозяевами, то есть наблюдается филогенетический параллелизм [1]. А поскольку пути миграции алтайских горных баранов и сибирских горных козлов в некоторых местах пересекаются с пастбищами для сельскохозяйственных животных, то мы получаем совокупность предрасполагающих (анатомическое сходство копытных хозяев) и определяющих (биоценотические связи) факторов для взаимообмена паразитофауной между дикими и домашними жвачными.

Таким образом, алтайские горные бараны и сибирские горные козлы вызывают особый исследовательский интерес: 1) сами по себе, как уникальная часть хрупкого биоразнообразия; 2) в качестве объектов питания краснокнижного хищника; 3) как потенциальные «доноры» и «реципиенты» паразитов мелкого рогатого скота; 4) как животные, способные интродуцировать паразитофауну из Монголии и в нее. При этом паразитофауна именно диких полорогих животных Республики Алтай изучена недостаточно [5], что и обуславливает актуальность нашей работы.

Материалы и методы

Объектами исследования стали дикие полорогие: алтайские горные бараны (*Ovis ammon ammon*) и сибирские горные козлы (*Capra sibirica*). В качестве материала мы использовали фекалии этих животных, собранные на путях их миграции во время добровольческих экспедиций «По следам снежного барса», проходивших на хребте

Рис. 1. Локация и объекты исследования

avvb_2021_03.indd 33 06.09.2021 7:52:20

Чихачева Кош-Агачского района Республики Алтай в 2019–2020 годах. Гарантировать сбор фекалий именно от изучаемых животных, а не от мелкого рогатого скота, нам позволили использованные фотоловушки, в частности, UltraFire XR6 (Reconyx, США) (Рис. 2). Однако идентифицировать индивидуальные пробы, полученные от алтайских гонных баранов и сибирских горных козлов, без генетической экспертизы не представлялось возможным из-за сходства размера, цвета, формы и структуры фекалий, поэтому на данном этапе мы будем говорить о совокупной паразитофауне этих полорогих.

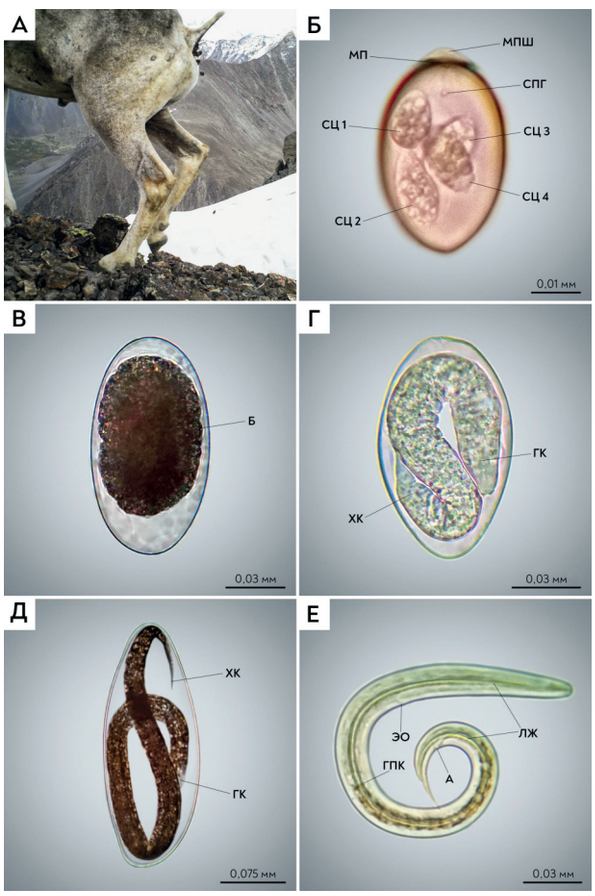


Рис. 2. Дикие полорогие и их эндопаразиты. А – зафиксированный момент дефекации алтайского горного барана; Б – спорулировавшая ооциста *Eimeria sp*. (МП – микропиле, МПШ – микропилярная шапочка, СПГ – светопреломляющая гранула, СЦ1–4 – спороцисты); В – незрелое яйцо желудочно-кишечной нематоды отряда *Strongylida* (Б – бластула); Г – яйцо с личинкой желудочно-кишечной нематоды отряда *Strongylida* (ГК – головной конец, ХК – хвостовой конец); Д – яйцо нематоды рода *Nematodirella* с неинвазионной личинкой внутри (ГК – головной конец, ХК – хвостовой конец); Е – личинка первого возраста (L1) нематоды рода *Protostrongylus* (ЛЖ – латеральный желоб, ЭО – экскреторное отверстие, ГПК – граница пищевода и кишечника, А – анус).

Свежие фекалии предварительно исследовали в полевых условиях гельминтоскопическим методом (осмотр на наличие целых гельминтов или их фрагментов), а также гельминтолярвоскопически (по методу Вайда) с помощью биологического микроскопа С-11 (Micromed, КНР).

Материал в количестве 12 проб доставили в Лабораторию по изучению паразитарных болезней на базе кафедры паразитологии им. В. Л. Якимова ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины». Лабораторную диагностику проводили по методу: 1) Шильникова (выделение личинок нематод); 2) Дарлинга (флотация яиц гельминтов с маленьким удельным весом + ооцист кокцидий); 3) последовательных промываний (седиментация яиц гельминтов с большим удельным весом).

Идентификацию гельминтов и протист мы производили, опираясь на их морфологические признаки, изученные во время сеансов светлопольной световой микроскопии временных микропрепаратов при помощи микроскопа «Микротон-200М» (Петролазер, Россия). Фотосъемку осуществляли с помощью камеры смартфона Honor 10 (Huawei, КНР). Определение линейных размеров паразитов проводили по полученным фотоснимкам в программе Figi/ImageJ (National Institutes of Health, США) с предварительной калибровкой по объект-микрометру ОМП (ЛОМО, Россия).

Результаты исследований

Выявленные объекты эндопаразитарной природы представлены на Рисунке 2 и в Таблице 1. В ходе осмотра фекалий эндопаразитов обнаружено не было.

Обсуждение результатов

Авторы отдают себе отчет в том, что смешанная выборка из 12-и проб фекалий никоим образом не может претендовать на репрезентативность, поэтому к результатам количественной копроскопии (ЭИ) следует отнестись с осторожностью. Однако мы не видим

avvb_2021_03.indd 34 06.09.2021 7:52:20

Таблица 1

Эндопаразитофауна алтайских горных баранов и сибирских горных козлов, обнаруженная в результате копрологических исследований

Процедура	Стадия развития эндопаразита	Систематическое положение	Локализация взрослых особей в организме хозяина	Экстенсивность инвазии, %
метод Шильникова	L1 *Protostrongylus sp.*	*Nematoda, Strongylida*	дыхательная система	67
метод последовательных промываний	L1 *Protostrongylus sp.*	*Nematoda, Strongylida*	дыхательная система	67
метод Дарлинга	*Oocysta Eimeria sp.*	*Apicomplexa, Coccidia*	пищеварительная система	83
	Ova	*Nematoda, Strongylida*	пищеварительная система	42
	Ova Nematodirella sp.	*Nematoda, Strongylida*	пищеварительная система	17

причин для того, чтобы игнорировать результаты качественной копроскопии (эндопаразитофауна). Нами обнаружены представители двух крупных таксономических групп: протист и круглых червей. Отсутствие среди наших находок представителей плоских червей, скорее всего, свидетельствует о необходимости дальнейших исследований в расширенном формате и с учетом различных сезонов, чем об отсутствии сосальщиков и ленточных червей среди эндопаразитов алтайских горных баранов и сибирских горных козлов.

В целом же, выявленная фауна вполне характерна и для мелких жвачных, и для изучаемой территории [8–10]. Так, например, Е. А Ефремова и В. А. Марченко сообщают об инвазии домашних овец Кош-Агачского района нематодами сем. *Protostrongylidae* в 2015 году: даже в суровых условиях высокогорной зоны ЭИ составила 13,6% [4]. Встречается *Protostrongylus* и в Монголии: как на высоте 1500–2000 м над уровнем моря, так и в лесостепной зоне [3, 6].

В исследованиях В. А. Марченко отмечается зараженность овец нематодами с преобладанием подотряда *Strongylata* желудочно-кишечного тракта [5]. В Сайлюгемском национальном парке (Кош-Агачский район) в 2016 году у мелкого рогатого скота также был зарегистрирован стронгилятоз, а в 2017 – эймериоз [4]. О находках *Nematodirella* не всегда сообщают дополнительно, поскольку эта нематода входит в группу стронгилид пищеварительного тракта (хотя, как видно из Рис. 2, яйца нематодиреллы обладают выдающимися размерами и потому легко отличимы от яиц других стронгилид). Однако в исследованиях Демидовой Л. Д., например, представители этого рода были обнаружены в Гоби (Монголия) у домашних коз [2].

Что касается достоверности проведенной идентификации, то мы постарались остаться максимально объективными. Так, ни одного паразита мы не смогли идентифицировать с точностью до вида, поскольку морфологических признаков для этого было недостаточно. Максимальной полнотой в этом смысле обладают полученные ооцисты, однако, в справочной литературе нам не удалось отыскать вид эймерии, чье описание полностью соответствует тому, что мы обнаружили в ходе исследования. *Protostrongylus* считается единственным евразийским родом своего семейства, у личинок L1 которого нет дорсального шипика (хотя с учетом завоза из Канады овцебыков появился риск интродукции *Orthostrongylus*, чьи личинки обладают аналогичной морфологией). Незначительные межвидовые отличия протостронгилюсов на уровне личинки в совокупности с внутривидовым полиморфизмом не позволили нам двинуться дальше рода в определения систематического положения этой немато-

avvb_2021_03.indd 35 06.09.2021 7:52:20

ды. В отношении же стронгилид желудочно-кишечного тракта известны попытки идентификации, основанные на размерах, форме и некоторых дополнительных признаках яиц, однако мы не рискнули довериться их результатам. Хотя из Рис. 2 видно, что яйца стронгилид отличаются между собой и очевидно принадлежат к разным родам, тем не менее, невозможно говорить об усредненном размере яиц для какого-то рода (за исключением нематодиреллы и нематодируса) по тем же причинам, что актуальны и для протостронгилюса. И даже индекс яйца (соотношение длины и ширины) не может быть надёжным критерием из-за разницы в форме (овальная, овоидная, эллиптическая и т. д.). Повысить точность диагностической процедуры можно при помощи: 1) культивирования личинок до инвазионной стадии, на которой их морфология детально описана (этот метод применяют в отношении желудочно-кишечных нематод); 2) молекулярно-филогенетических исследований, что и входит в наши дальнейшие планы.

Из обнаруженной эндопаразитофауны наиболее патогенными представляются протостронгилюсы, поскольку поражение дыхательной системы может быть смертельно опасным для хозяина. Присутствие эймерий и нематодирелл говорит в пользу юного возраста животных, в чьих фекалиях были обнаружены эти паразиты. Остальные же стронгилиды желудочно-кишечного тракта встречаются повсеместно, и некоторые авторы склонны рассматривать их как условно-патогенную нормофауну.

Заключение

Таким образом, в проведенном копрологическом исследовании диких полорогих животных на хребте Чихачева Кош-Агачского района Республики Алтай мы обнаружили личинок L1 нематод рода *Protostrongylus*, яйца нематод рода *Nematodirella*, яйца нематод желудочно-кишечного тракта отряда *Strongylida* и ооцисты протист рода *Eimeria*.

Ввиду недостаточного количества научных исследований в настоящее время нельзя сделать окончательные выводы о перекрестной инвазии продуктивных животных и диких полорогих, а также о распространении паразитических червей и протист в России (Алтай и Тыва) и Монголии. Необходимо продолжать мониторинг паразитарной ситуации диких полорогих животных хребта Чихачева, продуктивных животных близлежащих хозяйств, а также сбор информации о распространении эндопаразитофауны на изучаемой территории.

Список литературы

1. Демидова Л. Д. Исследование распространения гельминтозов среди коз и уровня их инвазированности в Монголии / Л. Д. Демидова // Ветеринария. 2005. № 2. С. 655.

2. Ефремова Е. А. Некоторые аспекты эпизоотологии гельминтозов коз в Республике Алтай / Е. А. Ефремова, В. А. Марченко // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. 2018. № 19. С. 158–160.

3. Ефремова Е. А. К эпизоотологии протостронгилидозов овец в Республике Алтай / Е. А. Ефремова, В. А. Марченко // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. 2015. № 19. С. 159–161.

4. Луницын В. Г. Гельминтофауна диких и домашних парнокопытных национального парка «Сайлюгемский» / В. Г. Луницын, В. И. Михайлов, М. Ю. Тишков [и др.] // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2017. № 4. С. 131–134.

5. Марченко В. А. Структура гельминтокомплекса овец Горного Алтая и эффективность противопараразитарной суспензии при гельминтозах овец / В. А. Марченко, Ю. А. Василенко // Российский паразитологический журнал. 2015. № 1. С. 7–14.

6. Пальцын М. Ю. Сохранение алтайского горного барана в трансграничной зоне России и Монголии / М. Ю. Пальцын, Б. Лхагвасурен, С. В. Спицын [и др.]. Красноярск, 2011. 54 с.

7. Скалдина О. В. Красная книга России / О. В. Скалдина. М.: Эксмо, 2012. С. 23–25.

8. Chartier C. Coccidiosis due to *Eimeria* in sheep and goats: a review / C. Chartier, C. Paraud // Small Ruminant Research. 2012. № 103. P. 84–92.

9. Sharkhuu T. Helminths of goats in Mongolia / T. Sharkhuu // Veterinary Parasitology. 2001. № 101. P. 161–169.

10. Sharkhuu G. The helminth fauna of wild and domestic ruminants in Mongolia: a review / G. Sharkhuu, T. Sharkhuu // European Journal of Wildlife Research. 2004. № 50. P. 150–156.

avvb_2021_03.indd 36 06.09.2021 7:52:20

DOI 10.24412/2074-5036-2021-3-37-40
УДК 619:616
Ключевые слова: гипотиреоз, собаки, щитовидная железа, трийодтиронин общий (ТТ3), тироксин общий (ТТ4), тиреотропный гормон (TSH), редокс-гомеостаз, углеводный обмен, липидный обмен.
Key words: hypothyreosis, dogs, thyroid gland, total triiodothyronine (TT3), total thyroxine (TT4), thyroid-stimulating hormone (TSH), redox homeostasis, carbohydrate metabolism, lipid metabolism.

Бабкина Т. Н., Ушакова Т. М.

КОРРЕЛЯЦИЯ РАССТРОЙСТВ РЕДОКС-ГОМЕОСТАЗА И УРОВНЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ГИПОТИРЕОЗЕ У СОБАК

CORRELATION OF REDOX HOMEOSTASIS DISORDERS AND METABOLIC PROCESSES IN HYPOTHYREOSIS IN DOGS

ФГБОУВО «Донской государственный аграрный университет».
Адрес: 346493, Россия, Ростовская обл., Октябрьский р-он, п. Персиановский, ул. Кривошлыкова, д. 24.
Don State Agrarian University.
Address: 346493, Russia, Rostov Region, Oktyabrsky District, village Persianovsky, Krivoshlykova street, 24.

Бабкина Татьяна Николаевна, кандидат ветеринарных наук, доцент, доцент кафедры терапии и пропедевтики, e-mail: babkina.55@list.ru
Babkina Tatyana Nikolaevna, PhD of Veterinary Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Therapy and Propedeutics, e-mail: babkina.55@list.ru
Ушакова Татьяна Михайловна, кандидат ветеринарных наук, доцент, заведующая кафедрой терапии и пропедевтики, e-mail: tanja_0802@mail.ru
Ushakova Tatyana Mikhailovna, PhD of Veterinary Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Therapy and Propedeutics, e-mail: tanja_0802@mail.ru

Аннотация. Метаболическое единство редокс-гомеостаза и морфофункционального состояния печени обусловливает вовлечение в патологический процесс при гипотиреозе у собак не только компонентов щитовидной железы, но и гепатобилиарной системы вследствие развития оксидативного стресса. В результате проведенных биохимических исследований крови больных собак при гипотиреозе (ТТ3 – 0,32±0,01 nmol/l; ТТ4 – 11,42±4,10 nmol/l; TSH – 5,69±0,19 nmol/l) было установлено нарушение метаболической активности печени, проявляющееся повышением каталитической активности ферментов сыворотки крови (AST – 60,20±6,01 U/l; GGT – 26,01±2,05 U/l), расстройством углеводного (GLU – 7,15±0,76 mmol/l) и липидного (CHOL – 7,83±0,70 mmol/l; fS-Trig – 1,06±0,03 μmol/l) обменов.
Summary. *The metabolic unity of the redox homeostasis and the morphofunctional state of the liver determines the involvement of not only the components of the thyroid gland, but also the hepatobiliary system in the pathological process in hypothyroidism in dogs due to the development of oxidative stress. As a result of biochemical studies of the blood of sick dogs with hypothyroidism (TT3 – 0.32±0.01 nmol/l; TT4 – 11.42±4.10 nmol/l; TSH – 5.69±0.19 nmol/l) a violation of the metabolic activity of the liver was found, manifested by an increase in the catalytic activity of serum enzymes (AST – 60.20±6.01 U/l; GGT – 26.01±2.05 U/l), a carbohydrate disorder (GLU – 7.15±0.76 mmol/l) and lipid (CHOL – 7.83±0.70 mmol/l; fS-Trig – 1.06±0.03 μmol/l) exchanges.*

Введение

Гипотиреоз — патология, развивающаяся вследствие дефицита тиреоидных гормонов в организме и характеризующаяся рядом патогномоничных признаков: вялость и апатия, увеличение массы тела, себорея и алопеция. В последние годы инцидентность манифестирующей формы гипотиреоза у собак достигает 1,5 %, а субклинической – 3,0 % [2, 5].

Кроме того, гипотиреоз является тяжелым эндокринным заболеванием, поскольку функциональные нарушения щитовидной железы влекут за собой ряд существенных патологических изменений в органах-мишенях, что сопровождается увеличением риска развития патологий кардиоваскулярной системы, повышенной вероятностью развития метаболического синдрома и сахарного диабета [3, 4].

Несмотря на серьезные достижения последних лет в понимании патогенеза этого заболевания, и по сей день гипотиреоз у собак остается важной клинической проблемой, как для выбора методов терапевтической

avvb_2021_03.indd 37 06.09.2021 7:52:20

коррекции, так и в прогностическом аспекте. Хронизация данной патологии, осложнения, связанные с расстройством метаболических процессов в организме, не позволяют в полной мере осуществлять комплекс лечебно-профилактических мероприятий при гипотиреозе у собак [1, 2].

Следовательно, разработка выверенного диагностического алгоритма при гипотиреозе у собак с учётом характера корреляции расстройств редокс-гомеостаза и уровня метаболических процессов является актуальным направлением в условиях современной ветеринарной медицины.

Цель исследований – изучить характер корреляции расстройств редокс-гомеостаза и уровня метаболических процессов при гипотиреозе у собак. Для реализации намеченной цели были поставлены следующие задачи: изучить клинический статус животных, морфологические, биохимические показатели крови, провести ультрасонографические исследования щитовидной железы у собак при гипотиреозе.

Материал и методы

Работа была выполнена в течение 2019–2021 годов на кафедре терапии и пропедевтики Донского государственного аграрного университета и на базе ветеринарной клиники «Вет-Сервис» (город Ростов-на-Дону), сети «Инвитро» филиал “VetUnion” (город Ростов-на-Дону).

С целью осуществления исследований были сформированы опытная и контрольная группы животных. В каждой группе было по 5-ть собак в возрасте от 3-х до 9-ти лет, больных гипотиреозом. Группы были подобраны по принципу пар-аналогов по мере поступления животных в ветеринарную клинику. Больные собаки – опыт, контролем служили клинически здоровые животные. Диагноз ставили на основании анамнеза, результатов клинического исследования, лабораторных исследований крови и ультрасонографического исследования щитовидной железы. Клиническое обследование больных и здоровых животных проводили по общепринятой методике.

После постановки диагноза у собак опытной и контрольной групп осуществляли забор крови и проводили морфологические и биохимические исследования. Кровь для морфологических и биохимических исследований брали из подкожной вены предплечья. В крови определяли уровень эритроцитов (RBC), лейкоцитов (WBC), концентрацию гемоглобина (HGB), гематокрит (HCT) на ветеринарном гематологическом анализаторе PCE-90 VET.

Уровень метаболических расстройств при гипотиреозе у больных животных изучали при помощи биохимического анализатора BIOBASE-8021A.При этом уровень холестерина (CHOL) определяли ферментативным методом, триглицеридов (fS-Trig) – ферментативным триггерным методом, глюкозы (GLU) – глюкозо-оксидазным методом, аспартатаминотрансферазы (AST) – по методу Генри, γ-глутамилтрансферазы (GGT) – методом Шаш. Уровень трийодтиронина общего (TT_3), тироксина общего (TT_4) и тиреотропного гормона (TSH) определяли на биохимическом анализаторе EOS BRAVO v.100 VET.

Осуществляли ультрасонографическое исследование щитовидной железы у больных животных на аппарате MindrayUMT-150, оценивая размер, эхогенность структуры органа.

Обработку результатов исследований проводили методом вариационной статистики с использованием интегрированной системы для комплексного статистического анализа и обработки данных в системе WindowsSTATISTICA, с использованием критерия Стьюдента по правилам вариационной статистики.

Результаты исследований

В результате проведённых клинических исследований больных животных было установлено угнетение, апатия, себорея, симметричные алопеции на груди, бедрах, паху, животе, увеличение массы тела. При этом у собак были выражены признаки эпидермального (поредение волосяного покрова, сухость, ломкость волос) и обменно-гипотермического синдромов (снижение температуры тела, периферическая вазоконстрикция), морда увеличена, припухлая,

avvb_2021_03.indd 38 06.09.2021 7:52:20

Таблица 1

Уровень метаболической активности крови у собак при гипотиреозе

Показатели	Группы животных						
	Больные (n=5)			Клинически здоровые (n=5)			Референсные значения
	X±Sx	maxX	minX	X±Sx	maxX	minX	
Эритроциты (RBC), 10^{12}/l	5,05±0,37**	5,50	4,45	6,90±0,24	7,16	6,59	5,20-8,40 (6,80)
Лейкоциты (WBC), 10^9/l	11,64±0,80	12,75	10,38	9,37±0,68	10,40	8,47	5,90-11,90 (8,90)
Гемоглобин (HGB), g/dl	89,05±3,20***	93,29	85,82	140,05±3,10	144,05	136,67	110,00-180,00 (145,00)
Холестерин (CHOL), mmol/l	7,83±0,70***	8,61	6,98	2,40±0,20	2,51	2,18	3,50-6,50 (5,00)
Триглицериды (fS-Trig), µmol/l	1,06±0,03***	1,10	1,03	0,39±0,02	0,40	0,37	0,24 – 0,98 (0,61)
Глюкоза (GLU), mmol/l	7,15±0,76***	8,09	6,28	4,30±0,29	4,67	3,95	3,30-6,10 (4,70)
γ-глутамил-трансфераза (GGT), U/l	26,01±2,05***	28,14	23,95	4,05±1,10	5,16	3,93	0,00-6,90 (3,45)
Аспартат-амино-транс-фераза (AST), U/l	60,20±6,01***	69,05	53,90	6,10±0,80	6,97	5,10	0,00-37,00 (18,50)
Трийод-тиронин общий (TT_3), nmol/l	0,32±0,01***	0,33	0,32	1,93±0,05	1,94	1,92	0,60-3,20 (1,90)
Тироксин общий (TT_4), nmol/l	11,42±4,10**	16,03	6,59	38,98±1,60	41,82	37,21	15,00-52,00 (33,50)
Тиреотропный гормон (TSH), nmol/l	5,69±0,19***	6,03	5,42	2,24±0,20	2,51	2,01	0,40-4,00 (2,20)

Примечание: * – P< 0,05; ** – P< 0,01; *** – P< 0,001 в сравнении с показателем клинически здоровых животных.

кожа неэластичная, холодная, веки сужены. У одной собаки опытной группы регистрировалась отечная форма, которая проявлялась выраженным отеком век и конъюнктивитом. При пальпации щитовидной железы у больных животных было установлено, что она увеличена, при этом ее размер составлял 20–30 мм в диаметре.

Температура тела больных животных была ниже физиологических пределов у здоровых животных (36,80±0,40 °C), отмечалась брадикардия (частота сердечных сокращений – 57,2±1,3 уд./мин.).

Уровень метаболической активности крови у собак при гипотиреозе характеризовался развитием гипохромной анемии (RBC – 5,05±0,37×10^{12}/l; HGB – 89,05±3,20 g/dl), экстремальные элементы вариационного ряда RBC составляли 5,50×10^{12}/l (maxX) и 4,45×10^{12}/l (minX), а HGB – 93,29 g/dl (maxX) и 85,82 g/dl (minX) (табл. 1.). При этом уровень эритроцитов (RBC) был ниже значений здоровых животных на 26,81 %, а гемоглобина (HGB) – на 36,42 %. Было выявлено развитие лейкоцитоза у животных опытной группы (WBC – 11,64±0,80×10^9/l), экстремальные элементы вариационного ряда WBC группе составляли 12,75×10^9/l (maxX) и 10,38×10^9/l (minX).

Жировой обмен у больных животных характеризовался развитием дислипидемии, проявляющейся увеличением уровня холестерина (CHOL – 7,83±0,70 mmol/l) и триглицеридов крови (fS-Trig – 1,06±0,03 µmol/l), при этом крайние элементы вариационного ряда были представлены следующим образом:

avvb_2021_03.indd 39 06.09.2021 7:52:20

CHOL (maxX – 8,61 mmol/l; minX – 6,98 mmol/l), fS-Trig (maxX – 1,10 μmol/l; minX – 1,03 μmol/l).

Углеводный метаболизм у животных опытной группы характеризовался повышением уровня глюкозы (GLU) до 7,15±0,76 mmol/l, что превышало показатель клинически здоровых животных на 66,28 %. Экстремальные элементы вариационного ряда глюкозы (GLU) равнялись 8,09 mmol/l – maxX и 6,28 mmol/l – minX (табл. 1).

Выявлено расстройство редокс-гомеостаза у собак при гипотиреозе, что сопровождалось выходом в кровь ферментов цитозоля: аспартатаминотрансферазы (AST – 60,20±6,01 U/l), γ-глутамилтрансферазы (GGT – 26,01±2,05 U/l). При этом уровень AST в опытной группе был выше показателя контрольной группы на 886,88 %, а GGT – на 542,22 %. Экстремальные элементы вариационного ряда AST составляли 69,05 U/l (maxX) и 53,90 U/l (minX), а GGT – 28,14 U/l (maxX) и 23,95 U/l (minX).

Функциональная активность щитовидной железы у больных животных сопровождалась снижением уровня трийодтиронина общего (TT_3 – 0,32±0,01 nmol/l) и тироксина общего (TT_4 – 11,42±4,10 nmol/l), и повышением тиреотропного гормона (TSH – 5,69±0,19 nmol/l) (табл. 1.). Так уровень трийодтиронина общего (TT_3) у больных животных был ниже показателя клинически здоровых животных на 83,42 %, тироксина общего (TT_4) – на 70,70 %, а тиреотропного гормона (TSH) выше – на 154,02 %. Крайние элементы вариационного ряда были представлены следующим образом: TT_3 (maxX – 0,33 nmol/l; minX – 0,32 nmol/l), TT_4 (maxX – 16,03 nmol/l; minX – 6,59 nmol/l), TSH (maxX – 6,03 nmol/l; minX – 5,42 nmol/l).

Результаты проведённых сонографических исследований щитовидной железы у собак при гипотиреозе указывали на увеличение органа в объеме. Эхоструктура органа была неоднородная, регистрировалось наличие участков с пониженной эхогенностью и умеренно неоднородной структурой с эхопризнаками узлов в долях. Наблюдалось снижение общей эхогенности железы.

Обсуждение результатов

Таким образом, при гипотиреозе у собак ведущим пусковым механизмом расстройства метаболических процессов выступает дефицит уровня трийодтиронина общего (TT_3) и тироксина общего (TT_4) на фоне повышения уровня тиреотропного гормона (TSH), что приводит к активации процессов перекисного окисления липидов, сопровождающееся расстройством каталитической активности ферментов сыворотки крови у больных животных и нарушением жирового и углеводного метаболизма.

Выводы

При гипотиреозе у собак прослеживается прямая корреляция между уровнем редокс-гомеостаза и характером метаболических расстройств, проявляющаяся повышением каталитической активности ферментов сыворотки крови, развитием гипергликемии и дислипидемии.

Список литературы

1. Бабкина Т. Н. Лечебно-профилактические мероприятия при эндемическом зобе крупного рогатого скота / Т. Н. Бабкина, Е. А. Крайнц // Ветеринария. 2008. № 11. С. 38–41.

2. Внутренние болезни животных: учебник / под общ. ред. Г. Г. Щербакова. СПб.: Лань, 2014. 712 с.

3. Ищенко С. Н. Тяжелые металлы, как одна из причин возникновения эндемического зоба / С. Н. Ищенко, Т. Н. Бабкина // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Современные достижения ветеринарной медицины сельскохозяйственному производству». Персиановский: ДонГАУ, 2009. С. 7–9.

4. Кондрахин И. П. Справочник ветеринарного терапевта и токсиколога / И. П. Кондрахин, В. И. Левченко, Г. А. Таланов. Под ред. профессора И. П. Кондрахина. М.: КолосС, 2005. 544 с.

5. Сломинский П. А. Генетические факторы риска патологии щитовидной железы / П. А. Сломинский, А. П. Мельников // Клиническая медицина. 2005. № 8. С. 42–47.

avvb_2021_03.indd 40 06.09.2021 7:52:20

DOI 10.24412/2074-5036-2021-3-41-48
УДК 619:578.835.2:615.371.004.12:616-076
Ключевые слова: количество инфекционных доз вируса бешенства, антирабическая вакцина, реакция амплификации, полимеразная цепная реакция.
Keywords: the amount of infectious doses of rabies virus, rabies vaccine, amplification reaction, polymerase chain reaction.

Доронин М. И., Михалишин Д. В., Борисов А. В., Груздев К. Н.

СПОСОБ ОПОСРЕДОВАННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ИНФЕКЦИОННЫХ ДОЗ ВИРУСА БЕШЕНСТВА В НЕИНАКТИВИРОВАННОМ СЫРЬЕ ДЛЯ ВАКЦИНЫ МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

METHOD FOR MEDIATED DETERMINATION OF THE AMOUNT OF INFECTIOUS DOSES OF RABIES VIRUS IN NON-INACTIVATED RAW MATERIALS FOR VACCINE BY PCR METHOD

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

Доронин М. И., к. б. н., вед. науч. сотрудник. E-mail: doronin@arriah.ru
Doronin M.I., PhD of Biological Science, Leading Researcher. E-mail: doronin@arriah.ru.
Михалишин Д. В., к. в. н., зав. лабораторией. E-mail: mihalishindv@arriah.ru
Michalishin D.V., PhD of Veterinary Science, Head of the Laboratory. E-mail: mihalishindv@arriah.ru
Борисов А. В., к. в. н., вед. науч. сотрудник. E-mail: borisov_av@arriah.ru
Borisov A.V., PhD of Veterinary Science, Leading Researcher. E-mail: borisov_av@arriah.ru
Груздев К. Н., д. б. н., профессор, Заслуженный ветеринарный врач РФ, трижды Лауреат Премии Правительства РФ в области науки и техники. E-mail: gruzdev@arriah.ru
Gruzdev K.N., Doctor of Biological Sciences, Professor, Honored Veterinarian of the Russian Federation, three times Laureate of the Prize of the Government of the Russian Federation in the field of science and technology. E-mail: gruzdev@arriah.ru

Аннотация. Технологический контроль при изготовлении живой антирабической вакцины из штамма РВ-97 вируса бешенства требует определения количества инфекционных доз вируса. В статье представлено описание способа опосредованного определения количества инфекционных доз вируса бешенства штамма РВ-97 в сырье для живой вакцины с применением метода ОТ-ПЦР-РВ. Данный способ позволяет снизить время проведения анализа до 4 ч, увеличить чистоту РНК вируса бешенства штамма РВ-97 за счет использования метода твердофазной экстракции с применением частиц цеолита, увеличить чувствительность и специфичность за счет применения оригинальных специфических олигонуклеотидов, удешевить исследование по сравнению с методом РИФ в клеточном монослое. Между значением количества инфекционных доз вируса бешенства штамма РВ-97 и пороговым циклом амплификации выявлена зависимость, отраженная в виде показательной функции с основанием 10 с высокими достоверностью аппроксимации (R^2 = 0,9927) и эффективностью амплификации 99,99 %. Разработанная математическая модель $КИД_{ВБ\ РВ\text{-}97} = 10^{\wedge(-0,3012 \cdot Ct\ +10,2040)}$ позволяет определять количество инфекционных доз вируса бешенства штамма РВ-97 в сырье для производства антирабической вакцины. В результате тестирования выявлено, что данные, полученные с помощью разработанного способа, коррелировали с результатами реакции иммунофлуоресценции в культуре клеток на 99,5–100 % для $10^{8,0\text{-}7,0}$ $ККИД_{50}$/мл (n=70), на 98–99,5 % для $10^{7,0\text{-}4,0}$ $ККИД_{50}$/мл (n=70), на 97–98,5% для $10^{4,0\text{-}3,0}$ $ККИД_{50}$/мл (n=70), на 94–98 % для $10^{3,0\text{-}2,0}$ $ККИД_{50}$/мл (n=70), на 93–98 % для $10^{2,0\text{-}1,0}$ $ККИД_{50}$/мл (n=70). Полученные результаты свидетельствовали о высокой степени точности разработанного способа. Аналитическая чувствительность метода составила 10^1 $ККИД_{50}$/мл, диагностическая чувствительность – 99,76 % (n=412), специфичность – 100,00 % (n=412), общая точность – 99,88 % (n=412). При исследовании прецизионности представленного способа в условиях воспроизводимости обнаружили, что значения коэффициента вариации находились в диапазоне 0,041–0,158 %, что соответствует общепринятым требованиям (Cδ<3 %).

Summary. *Technological control in the manufacture of a live rabies vaccine from the RV-97 strain of the rabies virus requires the determination of the number of infectious doses of the virus. The article describes a method for indirectly determining the number of infectious doses of rabies virus strain RV-97 in raw materials for a live vaccine using the real-time RT-PCR method. This method makes it possible to reduce the analysis time to 4 hours, to increase the purity of the*

avvb_2021_03.indd 41 06.09.2021 7:52:20

RNA virus of the RV-97 strain by using the solid-phase extraction method using zeolite particles, to increase the sensitivity and specificity due to the use of original specific oligonucleotides, to reduce the cost of the study in comparison with the IFR in cell monolayer. A relationship was revealed between the value of the number of infectious doses of the rabies virus strain RV-97 and the threshold amplification cycle, reflected in the form of an exponential function with a base 10 with a high accuracy of approximation (R^2 = 0.9927) and an amplification efficiency of 99.99 %. The developed mathematical model AIDRV RV-97 = 10 ^ (- 0.3012 • Ct +10.2040) allows determining the number of infectious doses of the rabies virus strain RV-97 in raw materials for the production of rabies vaccine. As a result of testing, it was revealed that the data obtained using the developed method correlated with the results of the immunofluorescence reaction in cell culture by 99.5–100 % for $10^{8.0-7.0}$ $TCID_{50}$ /ml (n = 70), at 98–99.5 % for $10^{7.0-4.0}$ $TCID_{50}$ /ml (n = 70), by 97–98.5 % for $10^{4.0-3.0}$ $TCID_{50}$ /ml (n = 70), by 94–98 % for $10^{3.0-2.0}$ $TCID_{50}$ /ml (n = 70), by 93–98 % for $10^{2.0-1.0}$ $TCID_{50}$ /ml (n = 70). The results obtained indicated a high degree of accuracy of the developed method. The analytical sensitivity of the method was 10^1 $TCID_{50}$/ml, diagnostic sensitivity – 99.76 % (n = 412), specificity – 100.00 % (n = 412), overall accuracy – 99.88 % (n = 412). In the study of the precision of the presented method under reproducibility conditions, it was found that the values of the coefficient of variation were in the range of 0.041–0.158 %, which corresponds to the generally accepted requirements (Cδ <3 %).

Введение

Бешенство – это острый прогрессирующий энцефаломиелит со смертельным исходом, вызываемый нейротропным вирусом. Возбудитель принадлежит порядку *Mononegavirales*, семейству *Rhabdoviridae*, включающему в себя рода *Lyssavirus*, *Ephemerovirus*, *Vesiculovirus*. Возбудители бешенства обнаружены на всех континентах, кроме Антарктиды, более чем в 100 странах мира. Многочисленные и разнообразные варианты лиссавирусов встречаются у самых разных видов животных по всему миру. Среди них классический вирус бешенства на сегодняшний день является довольно распространенной инфекцией человека и животных. Десятки миллионов потенциальных контактов с людьми и десятки тысяч смертей от вируса бешенства происходят каждый год. От бешенства ежегодно в мире умирает около 59 000 человек и более 1 млн животных [2, 3, 4].

Геном вируса бешенства представлен негативной молекулой РНК размером около 12000 н.о., который кодируют пять структурных белков: нуклеопротеин (N), фосфопротеин (P), матричный белок (M), гликопротеин (G) и РНК-направленную РНК-полимеразу (L) (рис. 1А) [2]. Белок N инкапсулирует геном РНК, образуя плотно закрученный комплекс N-РНК, известный как рибонуклеопротеин (РНП) [8]. РНП конденсируется вместе с L- и P-белком в спиральный нуклеокапсид. Белок P является некаталитическим кофактором для полимеразы. Белок M окружает нуклеокапсид, соединяя его с вирусной оболочкой [2]. G-белок взаимодействует с матриксным белком, является белком, экспонированным на поверхности оболочки вируса бешенства, и единственным лигандом для клеточных рецепторов [7, 11].

Стратегия транскрипции и репликации вируса бешенства отражена на рисунке 1Б, из которого видно, что геномная РНК (-) является матрицей. Во время транскрипции пять матричных РНК (мРНК) с кэпированным 5'-концом (C) и 3'-полиаденилированным концом кодируют вирусные N-, P-, M-, G-, L-белки. Во время репликации негативная РНК транскрибируется в позитивную РНК, а затем снова транскрибируется в РНК (-) для завершения репликации [9].

Бешенство вызывает серьезные потери, которые связаны с гибелью людей и животных, ликвидацией последствий вспышек заболевания, проведением профилактических и карантинных мероприятий, регулированием численности диких плотоядных животных, отловом бродячих кошек и собак и осуществлением лабораторных исследований по постановке диагноза. Комплекс мер, направленных на борьбу с бешенством и его профилактику, включает в себя применение оральных вакцин для диких плотоядных, в том числе лисиц, которые являются важным резервуарным хозяином вируса бешенства в России и Европе [2, 4, 8], а также использование инактивированных сорбированных и эмульсионных вакцин для домашних и сельскохозяйственных животных.

При изготовлении антирабических вакцин вируссодержащую суспензию исследуют на определение количества инфекционных доз (КИД) вируса бешенства для оценки

avvb_2021_03.indd 42 06.09.2021 7:52:20

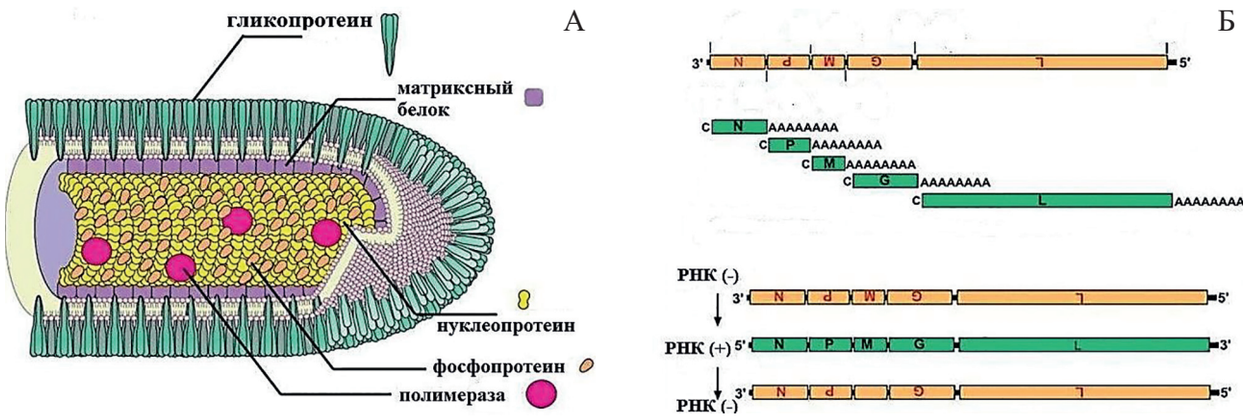


Рис. 1. Характеристика вируса бешенства (А – Структура вириона, Б – Стратегия транскрипции и репликации вируса бешенства).

его активности в клетках [5, 12]. В 1,0 см^3 суспензии вируса определяют количество клеточных культуральных инфекционных доз, вызывающих 50 %-ное поражение клеток (ККИД50/мл), что фактически отражает концентрацию вирионов, содержащих РНК вируса бешенства. В классическом варианте для этих целей используют монослойную клеточную линию почки новорожденного сирийского хомячка ВНК-21, с помощью которой вычисляют минимальную дозу вируса, способную вызвать лизис 50 % клеток в реакции иммунофлуоресценции (РИФ) [2]. У данного метода есть некоторые недостатки: длительная процедура анализа, связанная с репродукцией вируса в клетках (не менее 3 суток); определенная степень субъективности при оценке результатов исследования; высокая стоимость клеточной линии как тест-системы и затраты на ее поддержание; высокая вероятность риска контаминации культуры клеток [8, 10].

Исходя из этого целесообразно разработать способ опосредованного определения количества инфекционных доз вируса бешенства в сырье для антирабической вакцины на основе полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [10]. Данный метод является высокочувствительным, специфичным и позволяет проводить исследование в течение 4 часов, не требует использования клеточных линий для анализа, снижает риск контаминации исследуемых образцов.

В настоящее время представленный метод широко применяют для диагностики различных инфекционных заболеваний, в том числе бешенства, а также для опосредованного количественного определения вирусной нагрузки суспензий вируса ящура [2, 8, 10]. Однако, для определения количества инфекционных доз вируса бешенства в сырье для вакцин ранее данный метод не применялся.

Цель исследования заключалась в разработке и апробировании способа опосредованного определения количества инфекционных доз вируса бешенства в неинактивированном сырье для вакцины с применением ПЦР-РВ.

Материалы и методы

Вирус. Для исследований использовали неинактивированные суспензии вируса бешенства штамма РВ-97, применяемого для изготовления антирабических вакцин.

Выделение нуклеиновой кислоты. Элюирование нуклеиновой кислоты проводили методом твердофазной экстракции с применением частиц цеолита с диаметром 350 мкм и хаотропной смеси, состоящей из 3М

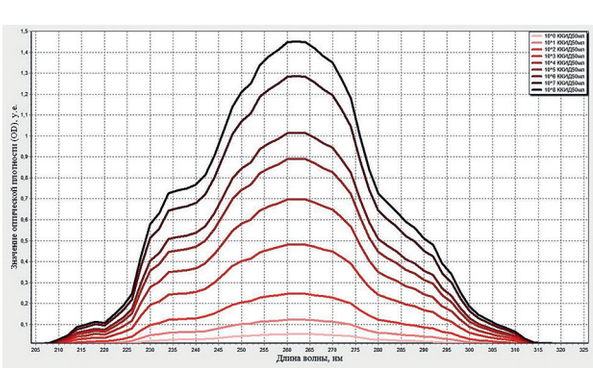


Рис. 2. Спектры поглощения экстрактов РНК вируса бешенства штамма РВ-97 стандартных образцов (n=3).

avvb_2021_03.indd 43 06.09.2021 7:52:20

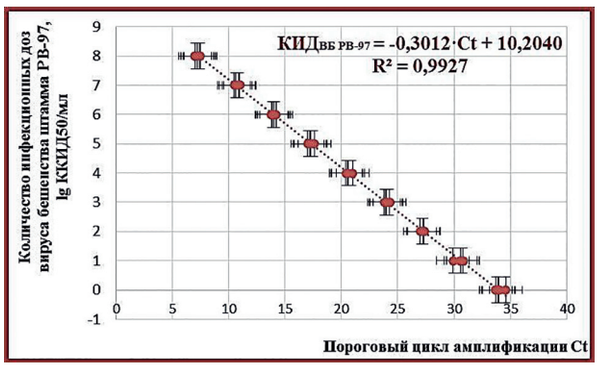


Рис. 3. Зависимость величины порогового цикла амплификации и количества инфекционных доз вируса бешенства штамма РВ-97 (n=4, отмечены точки, отображающие средние значения пороговых циклов амплификации кДНК)

раствора мочевины и 3М раствора гуанидинизотиоцианата (1:1 по объему). Отмывание цеолитовых частиц осуществляли с применением 80 % раствора изопропанола. Для элюирования РНК используют буфер ТЕ (10 мМ трис(оксиметил)аминометан, 1 мМ этилендиамин-тетраацетат, pH 7,3).

Спектральный анализ проводили, определяя поглощение экстрактом РНК монохроматического ультрафиолетового света, что позволяет оценить степень чистоты экстракта, который в последующем тестируют в реакции амплификации. Измерения спектральной поглощающей способности образцов проводят при длинах волны в диапазоне 205–325 нм и температуре 22–25 °С.

Проведение обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ). Для постановки реакции использовали компоненты, которые представлены в таблице 1. Применяли следующие олигонуклеотидные праймеры и зонд: upstream-5'-NF-RV-97-quant-, downstream-5'-NR-RV-97-quant-праймер и 5'-NP-RV-97-quant-Cy5/BHQ3-зонд. Их дизайн представлен в таблице 2. Для проведения реакции использовали дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (по 0,2 мМ), хлорид магния (2 мМ), Taq-буферный раствор Colorless Flexi (5х), ферменты AMV-ревертазу (10 е.а.) и ДНК-зависимую ДНК-полимеразу (10 е.а.).

Обратную транскрипцию проводят при температуре 42 ºС в течение 15 мин. Перед проведением ПЦР-РВ осуществляют предварительный прогрев смеси при температуре 95 ºС в течение 5 мин. для активации фермента Taq-ДНК-полимеразы и инактивации AMV-ревертазы. ПЦР-РВ включает в себя 3 подэтапа: денатурацию, отжиг праймеров и зонда, элонгацию. Денатурацию проводят при температуре 95 ºС в течение 10 с, отжиг олигонуклеотидов – при температуре 56 ºС в течение 30 с, элонгацию – при температуре 68 ºС в течение 30 с.

Статистическая обработка результатов проводилась при определении средних арифметических значений и достоверности статистической разницы между средними

Таблица 1

Состав реакционной смеси для определения количества инфекционных доз вируса бешенства штамма РВ-97 методом ОТ-ПЦР-РВ

Наименование компонента смеси	Концентрация компонента
Upstream-5'-NF-RV-97-quant-праймер (50 пМ)	5 пМ
Downstream-5'-NR-RV-97-quant –праймер (50 пМ)	5 пМ
5'-NP-RV-97-quant -Cy5/BHQ3-зонд (50 пМ)	5 пМ
Дезоксирибоаденозинтрифосфат (dATP, 25 мМ)	по 0,20 мМ каждого
Дезоксирибогуанозинтрифосфат (dGTP, 25 мМ)	
Дезоксирибоцитидинтрифосфат (dCTP, 25 мМ)	
Дезоксириботимидинтрифосфат (dTTP, 25 мМ)	
Хлорид магния (25 мМ)	2 мМ
Taq-буферный раствор Colorless Flexi (х 5)	20 % от объема реакционной смеси
AMV-ревертаза	10 е.а.
ДНК-зависимая ДНК-полимераза	10 е.а.

Примечание: объем вносимого элюата РНК – 5 мкл, объем реакционной смеси – 25 мкл.

avvb_2021_03.indd 44 06.09.2021 7:52:21

величинами, определенными по разностному методу Стьюдента-Фишера. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p<0,005$. Валидационные характеристики методики, в том числе достоверность, аналитическую чувствительность, диагностическую чувствительность и специфичность, общую точность, коэффициент осцилляции, коэффициент вариации и др. определяли в соответствии с международными рекомендациями [1, 13].

Результаты исследований и обсуждение

На первом этапе исследования проводили разработку способа опосредованного определения КИД вируса бешенства в сырье для вакцин с применением метода ПЦР-РВ. Для этого подготавливают контрольную панель стандартов вируса бешенства штамма РВ-97, в качестве которых используют суспензии вируса бешенства указанного штамма с КИД: 10^0, 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8 $ККИД_{50}/см^3$. В качестве отрицательных контролей применяют суспензию клеток ВНК-21, не зараженную вирусом бешенства. Из всех стандартных положительных образцов и отрицательных контролей выделяли нуклеиновую кислоту. Для этого применяли частицы цеолита с диаметром 350 нм. Учитывая, что размер вирионов составляет 100–300 х 45–100 нм, частицы цеолита диаметром 350 нм подходят для сорбирования вируса бешенства. Для лизиса белковых клеточных структур и вирусных частиц, а также ингибирования РНКаз и ДНКаз используют хаотропную смесь, а именно 3М мочевину и 3М гуанидинизотиоцианат в соотношении 1:1. Данный комплекс денатурирует белковые молекулы и нуклеиновые кислоты. Хаотропные компоненты в растворенном состоянии увеличивают энтропию системы путем нарушения межмолекулярных взаимодействий, а именно, водородных связей, ван-дер-ваальсовых сил и гидрофобных эффектов. Структура и функции макромолекул определяются влиянием данных сил, поэтому увеличение концентрации хаотропных растворенных веществ в биологической системе приводит к денатурации белков и нуклеиновых кислот. Кроме того, используемые хаотропные агенты уменьшают гидрофобные взаимодействия между молекулами и, тем самым, влияют на липидный слой клеток и вириона вируса бешенства, что приводит к лизису [10].

На следующем этапе исследования с помощью спектрального анализа в излучении ультрафиолетового света проводили оценку степени чистоты полученных элюатов нуклеиновой кислоты. Значения экстинкции образцов в диапазоне от 205 до 325 нм осуществляли через каждые 2 нм, производя запись спектра поглощения РНК с помощью компьютерной программы Spectrum v. 5.0 (рисунок 2). Из рисунка 2 следует, что значения $OD_{205-259}$ и $OD_{261-325}$ не превышали OD_{260}, что является признаком высокой степени чистоты полученных элюатов РНК (n=3). Отмечали отсутствие выраженных пиков на графиках при длинах волны 205, 235, 270, 280 и 320 нм, что свидетельствовало о практически полном отсутствии загрязнения экстрактов РНК примесями фосфолипидов, полисахаридов и остатков ГТЦ, полипептидов и крупных конгломератов, соответственно. Значения коэффициентов экстинкции (R_1) для стандартов приближены к норме 2,000 (R_1 = 1,994-2,000), что подтверждало отсутствие ДНК и наличие лишь следовых количеств примесей белка. Деградации нуклеиновой кислоты и наличия свободных нуклеотидов в элюатах не наблюдалось, так как R_1 не превышал 2,000. Экстракты вирусной РНК не загрязнены полисахаридами и ГТЦ, поскольку значения коэффициента экстинкции (R2) приближены к норме 2,000 и соответствовали 1,998–2,000. Учитывая, что при замещении 1 % РНК на углеводы значение R_2 уменьшается на 0,002, в полученных экстрактах наличие полисахаридных примесей составило не более 1 %, что допустимо [10].

Полученные экстракты РНК вируса бешенства штамма РВ-97, выделенные из контрольных образцов с разным количеством инфекционных доз, исследовали в ОТ-ПЦР-РВ, как описано в разделе «Материалы и методы». Постановку реакции проводили в 4 повторностях. В качестве гомологичных участку N-гена вируса бешенства штамма РВ-97 для проведения реакции амплификации применяли следующие праймеры: upstream-

avvb_2021_03.indd 45 06.09.2021 7:52:21

Таблица 2

Дизайн оригинальных олигонуклеотидов для реакции амплификации нуклеиновой кислоты вируса бешенства для определения количества инфекционных доз

Наименование олигонуклеотидов	Последовательность олигонуклеотидов (5'…3')	Локализация, н.о.	Расчетная длина ампликона, п.н.
upstream-5'-NF-RV-97-quant-праймер	GACATGTTTTTCTCCCGGA	701…719	604
downstream-5'-NR-RV-97-quant-праймер	TCATCATGATTCGAGCATAAAC	1283…1304	
5'-NP-RV-97-quant-Cy5/BHQ3-зонд	Cy5-GTTTACTGGGTTTGTAAAGCA-BHQ3	793…813	

5'-NF-RV-97-quant, downstream-5'-NR-RV-97-quant и 5'-NP-RV-97-quant-Cy5/BHQ3-зонд, нуклеотидные последовательности которых отражены в Таблице 2. Их дизайн подбирали в соответствии с общепринятыми требованиями [10, 13]. Размеры прямого, обратного праймера и зонда составляют 19, 21 и 22 н.о., что соответствует требованиям [10, 13]. Нуклеотидная последовательность зонда не комплементарна праймерам. Отсутствуют 4 и более подряд одинаковых нуклеотидов в составе праймеров и зонда. Флуорофор Cy5 присоединен к 5'-концу, а гаситель флуоресценции BHQ3 – к 3'-концу. Данные условия соответствуют требованиям, предъявляемым к олигонуклеотидным праймерам и молекулярному зонду, которые участвуют в реакции [10, 13]. В качестве флуоресцентного красителя был выбран Cy5 с длиной волны максимальной флуоресценции 670 нм. Для тушения свечения использовали гаситель флуоресценции BHQ3 с длиной волны максимального поглощения при 672 нм и возможном диапазоне гашения 620–730 нм. Иными словами, была выбрана подходящая пара «флуорофор-гаситель». Размер ампликона составляет 604 п.н.

Выявлено, что для олигонуклеотидов не характерно образование «шпилек», а также не обнаружено 3'-комплементарности и сайтов, отжигающих сами на себя при условии, когда минимальное количество пар оснований, необходимое для димеризации праймера и шпильки – 4.

Была определена температура отжига праймеров и зонда по кривым плавления гетеродимера олигонуклеотида и матрицы с помощью модели фолдинга. Данные температуры для upstream-5'-NF-RV-97-quant, downstream-5'-NR-RV-97-quant и 5'-NP-RV-97-quant-Cy5/BHQ3 составляют 55, 56, 56 °C, соответственно. Для проведения реакции амплификации было решено проводить гибридизацию праймеров и зонда с участком N-гена вируса бешенства штамма РВ-97 при температуре 56 °C.

Последовательности оригинальных олигонуклеотидов исследовали на наличие нежелательных совпадений с другими последовательностями нуклеиновых кислот с использованием GenBank данных последовательности кДНК вируса бешенства [6]. Подобранные нуклеотидные последовательности проанализировали на наличие внутренних вторичных структур с помощью компьютерной программы Mfold, в результате этого выявили, что для разработанных олигонуклеотидов наличия внутренних вторичных структур не определено.

Результаты ОТ-ПЦР-РВ анализировали, сравнивая графики накопления флуоресцентного сигнала по значениям пороговых циклов амплификации (C_t), полученных с помощью пересечения пороговой линии и экспоненциальной кривой функции $Fl = f(C_t)$. Устанавливали зависимость между пороговым циклом амплификации и количеством инфекционных доз вируса бешенства штамма РВ-97 ($КИД_{ВБ\ РВ-97}$) в сырье для антирабической вакцины. Полученные данные отражены на рисунке 3 и выражены в виде показательной функции с основанием 10: $КИД_{ВБ\ РВ-97} = 10^{\wedge(-0,3012 \cdot Ct\ +10,2040)}$. Оценивали величину эффективности реакции ампли-

avvb_2021_03.indd 46 06.09.2021 7:52:21

фикации (Е) по формуле: $E=(10^{-1/k}-1)$ (k брали из функции $C_t = 10^{\wedge(-k\cdot КИДвб\ рв-97+b))}$, а также достоверность аппроксимации (R^2). Эффективность реакции амплификации составила 99,99 %, достоверность аппроксимации – 0,9927, что соответствовало общепринятым требованиям, предъявляемым к молекулярно-биологическим тест-системам [10].

На следующем этапе работы проводили исследование валидационных показателей разработанного способа. Для анализа использовали 350 суспензий культурального вируса бешенства производственного штамма РВ-97 с количеством инфекционных доз от $10^{1,00}$ до $10^{8,00}$ $ККИД_{50}/см^3$. В качестве положительного контроля применяли суспензию культурального вируса бешенства штамма РВ-97 с титром вируса $10^{7,00}$ $ККИД_{50}/см^3$. В качестве отрицательных контролей применяли суспензию клеток ВНК-21, не зараженную вирусом бешенства. Исследуемые пробы и контрольные образцы анализировали в трех повторностях в ОТ-ПЦР-РВ и классическим методом титрования в монослойной клеточной линии ВНК-21 с применением специфического иммуноглобулина G, меченого флуоресцеинизотиоцианатом. Выявили, что данные, полученные с помощью разработанного способа, коррелировали с методом РИФ в культуре клеток на 99,5–100 % для $10^{8,0-7,0}$ $ККИД_{50}/см^3$ (n=70), на 98–99,5 % для $10^{7,0-4,0}$ $ККИД_{50}/см^3$ (n=70), на 97–98,5 % для $10^{4,0-3,0}$ $ККИД_{50}/см^3$ (n=70), на 94–98 % для $10^{3,0-2,0}$ $ККИД_{50}/см^3$ (n=70), на 93–98 % для $10^{2,0-1,0}$ $ККИД_{50}/см^3$ (n=70). Полученные результаты свидетельствовали о высокой степени точности разработанного способа.

Аналитическую чувствительность метода ОТ-ПЦР-РВ для опосредованного определения количества инфекционных доз вируса бешенства в сырье для вакцин проводили, используя положительные стандарты вируса бешенства со следующими КИД вируса бешенства: 10^0, $10^{0,5}$, 10^1, $10^{1,5}$, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8 $ККИД_{50}/мл$. Испытуемые контрольные образцы исследовали в 5 повторностях разработанным способом. Все этапы работы осуществляли, как описано выше. Выявлено, что аналитическая чувствительность метода составила 10^1 $ККИД_{50}/мл$.

Для определения чувствительности метода тестировали 412 образцов суспензий, которые являлись заведомо положительными по данным исследования методом РИФ в клеточной линии ВНК-21. Постановку теста проводили, как отражено выше. В результате анализа с помощью разработанного способа определили, что количество достоверно положительных – 411, а ложноотрицательных – 1. Таким образом, чувствительность метода составила 99,76 %.

Специфичность метода определяли при исследовании 412 образцов суспензий, которые являлись отрицательными по данным исследования в РИФ. По итогам анализа с помощью разработанного способа определили, что количество достоверно отрицательных – 412. Таким образом, специфичность разработанного теста составила 100,00 %. Учитывая полученные данные, рассчитали общую точность метода, которая соответствовала 99,88 %.

Параметры прецизионности метода опосредованного определения количества инфекционных доз вируса бешенства в условиях воспроизводимости исследовали при тестировании суспензий вируса бешенства двумя операторами в разное время в 20 повторностях. Для генеральной совокупности значений C_t размах вариации составил 0,07–0,54, среднее линейное отклонение находилось в диапазоне 0,006–0,055 (менее 0,5), иными словами, степень колеблемости в выборках относительно среднего уровня признака низкая. Дисперсия составила 0,001–0,008, среднее квадратичное отклонение – 0,009–0,078, что подтверждает незначительную степень отклонений индивидуальных значений C_t от среднего арифметического и высокий уровень достоверности данных внутри каждой выборки. Значения коэффициента осцилляции находились в диапазоне от 0,324 до 1,544 %, линейный коэффициент вариации составлял 0,039–0,155 %, коэффициент вариации – 0,041–0,158 %, что соответствует общепринятым требованиям (Cδ<3 %) [1, 13]. Иными словами, по показателям вариации

avvb_2021_03.indd 47 06.09.2021 7:52:21

представленный способ удовлетворял критериям приемлемости.

Заключение

Разработан способ опосредованного определения количества инфекционных доз вируса бешенства штамма РВ-97 в сырье для вакцины с применением метода ОТ-ПЦР-РВ, который дает возможность снизить время проведения анализа до 4 ч; увеличить чистоту РНК вируса бешенства штамма РВ-97 за счет использования метода твердофазной экстракции с применением частиц цеолита; увеличить чувствительность и специфичность за счет применения оригинальных специфических олигонуклеотидов; удешевить исследование по сравнению с методом РИФ в клеточном монослое.

Выявлено, что между количеством инфекционных доз вируса бешенства штамма РВ-97 и пороговым циклом амплификации установлена зависимость, отраженная в виде показательной функции с основанием 10 с высокими достоверностью аппроксимации (R^2 = 0,9927) и эффективностью амплификации 99,99 %. Разработанная математическая модель $КИД_{ВБ\ РВ\text{-}97} = 10^{\wedge(-0,3012 \cdot Ct\ +10,2040)}$ позволяет определять количество инфекционных доз вируса бешенства штамма РВ-97 в сырье для производства антирабической вакцины.

Обнаружено, что данные, полученные с помощью разработанного способа, коррелировали с методом РИФ в культуре клеток на 99,5–100 % для $10^{8,0\text{-}7,0}$ $ККИД_{50}/см^3$ (n=70), на 98–99,5 % для $10^{7,0\text{-}4,0}$ $ККИД_{50}/см^3$ (n=70), на 97–98,5 % для $10^{4,0\text{-}3,0}$ $ККИД_{50}/см^3$ (n=70), на 94–98 % для $10^{3,0\text{-}2,0}$ $ККИД_{50}/см^3$ (n=70), на 93–98 % для $10^{2,0\text{-}1,0}$ $ККИД_{50}/см^3$ (n=70). Полученные результаты свидетельствовали о высокой степени точности разработанного способа.

Определено, что аналитическая чувствительность метода составила 10^1 $ККИД_{50}$/мл, диагностическая чувствительность – 99,76 % (n=412), специфичность – 100,00 % (n=412), общая точность – 99,88 % (n=412).

Проведено исследование прецизионности представленного способа в условиях воспроизводимости. Значения коэффициента осцилляции находились в диапазоне от 0,324 до 1,544 %, линейный коэффициент вариации составлял 0,039–0,155 %, коэффициент вариации – 0,041–0,158 %, что соответствует общепринятым требованиям (Cδ<3 %) Подтверждена высокая степень прецизионности в условиях воспроизводимости для разработанного способа, что позволяет его применять для определения количества инфекционных доз вируса бешенства штамма РВ-97.

Список литературы

1. Васильева, Л. А. Статистические методы в биологии, медицине и сельском хозяйстве: учеб. пособие / Л. А. Васильева. Новосибирск.: Институт цитологии и генетики СО РАН, 2007. 124 с.

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

3. Echevarría J. E. Current Rabies Vaccines Do Not Confer Protective Immunity against Divergent Lyssaviruses Circulating in Europe / J. E. Echevarría, A. C. Banyard, L. M. McElhinney, A. R. Fooks // Viruses. 2019. V. 11(10):E892. 10.3390/v11100892.

4. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control // The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. EFSA Journal. 2019. V. 17(12):5926, 276 pp. http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926.

5. Gautret P. Rabies vaccination for international travelers/ P. Gautret, P. Parola // Vaccine. 2012. 30(2):126-33. 10.1016/j.vaccine.2011.11.007.

6. GenBank. [Электронный ресурс] / URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov. (Дата обращения: 18.02.2021).

7. Levin S. N. Infections of the nervous system / S. N. Levin, J. L. Lyons // Am J. Med. 2018. V. 131. P. 25–32.

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

10. Okumura A., Harty R.N. Rabies virus assembly and budding Adv / A. Okumura, R. N. Harty // Virus Res. – 2011. – V. 79. – P. 23-–32.

12. PCR. Methods and Protocols / ed. L. Dominques. 2017. 283 p. DOI 10.1007/978-1-4939-7060-5.

13. Schnell M. J. The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. / M. J. Schnell, J. P. McGettigan, C. Wirblich , A. Papaneri // Nat Rev Microbiol. 2010. V. 8. P. 51–61.

14. Taylor E. Avoiding preventable deaths: The scourge of counterfeit rabies vaccines / E. Taylor, A. C. Banyard, H. Bourhy, F. Cliquet, H. Ertl, C. Fehlner-Gardiner, et al. // Vaccine. 2019. V. 37(17). P, 2285–2287. 10.1016/j.vaccine.2019.03.037.

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

avvb_2021_03.indd 48 06.09.2021 7:52:21

DOI 10.24412/2074-5036-2021-3-49-51
УДК: 619:612.858.71
Ключевые слова: кошка, слух, норма слуха, BAER-тест, вызванные слуховые потенциалы
Key words: cat, hearing, hearing norm, BAER-test, evoked auditory potentials

Чуваев И. В., Будник Ж. С.

НОРМА СЛУХА У КЛИНИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ КОШЕК
HEARING NORM IN CLINICALLY HEALTHY CATS

ООО «Институт Ветеринарной Биологии» Адрес: 197198, Санкт-Петербург, ул. Ораниенбаумская, д. 3-Б
Institute of Veterinary Biology, Ltd. Address: 197198, Saint-Petersburg, Oranienbaumskaya str., 3-Б

Чуваев Игорь Валерьевич, к. б. н., главный ветеринарный врач ООО «Институт Ветеринарной Биологии».
Тел. (812) 232-55-92, e-mail: virclin@mail.ru
Chuvaev Igor Valerjevich, PhD in Biological Sciences, Chief Veterinary Officer of Clinic "Institute of Veterinary Biology", Ltd. Tel. +7 812 232-55-92, e-mail: virclin@mail.ru
Будник Жанна Сергеевна, ветеринарный врач клиники ООО «Институт Ветеринарной Биологии».
Тел. (812) 232-55-92
Budnik Zhanna Sergeevna, Veterinarian of Clinic "Institute of Veterinary Biology", Ltd. Tel. +7 812 232-55-92

Аннотация. Исследование выполнено на 14-ти клинически здоровых кошках, разных пород и пола в возрасте от шести месяцев до трех лет. С помощью регистратора вызванных слуховых потенциалов Baercom UFI и штатного программного обеспечения Baercom PC у кошек было выполнено количественное определение слуха по методу Чуваева. BAER-тест проводили в стандартных условиях ветеринарной клиники с обязательным применением релаксантов (2 % ксилазин). Поличастотные звуковые импульсы посылали через ушной микрофон пакетами, по 25 пакетов для каждого уха, мощность сигнала: 70 ДБ. Как было установлено в процессе исследования, у обследованной группы кошек, достоверной разницы по звуковой чувствительности между правым и левым ухом не выявлено. Усредненная норма слуха для кошек составляла 70± 4.8 ед. для одного уха. Следует отметить, что в группе обследованных животных наблюдался довольно большой разброс данных по слуховой чувствительности (от 49 ед. до 140 ед. для одного уха), что возможно связанно с породными особенностями нормы слуха.
Полученные данные следует учитывать при проведении экспертизы слуха у кошек.

Summary. *The study was performed on 14 clinically healthy cats of different breeds and sexes aged from six months to three years. Using the Baercom UFI evoked auditory potentials recorder and the standard Baercom PC software, a quantitative test of cats' hearing was performed using Chuvaev's method. The BAER-test was performed under standard conditions of a veterinary clinic with the mandatory use of relaxants (2 % xylazine). Multi-frequency sound pulses were sent through the ear microphone in packets, 25 packets for each ear, with the signal strength 70 DB. The study showed that the cats in the examined group had no significant differences in sound sensitivity between the right and the left ears. The average hearing norm for cats was 70± 4.8 units for one ear. It should be noted that in the group of examined animals there was a fairly large spread of data on auditory sensitivity (from 49 units to 140 units for one ear), which may be related to the breed characteristics of the hearing norm. The data obtained should be taken into account when conducting cats' hearing.*

Введение

Слух является одним из важнейших органов чувств. Для хищников, для животных ведущих ночной образ жизни, слух зачастую не менее важен, чем, например, зрение или обоняние, особенно если речь идет о представителях дикой природы.

Вопросами контроля слуха домашних животных и, в частности, собак давно занимаются зарубежные исследователи [6, 7, 8], а в последние годы это направление заинтересовало и отечественных ученых [2, 3, 5].

Следует отметить, что большинство исследований, касающихся этого вопроса, связанны в основном с изучением наследственных аспектов тугоухости и глухоты у собак и допуском их в племенное разведение. [1, 7].

Благодаря разработке методов количественного определения слуха/тугоухости, были определены границы нормального слуха для собак различных пород [5], в то же время исследований нормы слуха у кошек, в доступной нам литературе обнаружено не было. Учитывая, что кошки являются хищниками и в процессе охоты на грызунов слух играет основополагающую роль, можно предположить, что острота слуха у кошек может быть выше, чем у собак.

avvb_2021_03.indd 49 06.09.2021 7:52:21

Таблица 1

Абсолютные значения количественной оценки слуха кошек для правого и левого уха

Номер животного	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Левое ухо	79	83	89	83	47	89	56	70	115	97	49	140	47	61
Правое Ухо	72	84	78	75	59	57	38	73	98	41	56	45	44	36
Правое и левое ухо суммарно	151	167	167	158	106	146	94	143	213	138	105	185	91	97

Целью настоящего исследования было определение нормы слуха для клинически здоровых кошек.

Материалы и методы

Исследование было выполнено на 14 клинически здоровых кошках различных пород, а также беспородных, различных полов, в возрасте от 6 мес. до 3 лет. Кошек более старшего возраста не учитывали с целью исключения приобретенных и возрастных нарушений слуха. Также из исследования были исключены животные с одно- или двусторонней глухотой и явно выраженной тугоухостью.

Все кошки предварительно проходили клинический осмотр и отоскопию с целью исключения отитов и других болезней органов слуха, способных повлиять на результаты исследования.

Контроль слуха осуществляли энцефалографическим методом – BAER-тест, который на сегодняшний день является наиболее объективным, точным и признанным методом контроля слуха у животных [7].

BAER-тест проводили в стандартных условиях ветеринарной клиники с обязательным применением релаксантов (2 % ксилазин).

Исследование было выполнено с использованием регистратора вызванных слуховых потенциалов Baercom UFI и штатного программного обеспечения Baercom PC. Поличастотные звуковые импульсы посылали через ушной микрофон пакетами, по 25 пакетов для каждого уха. Во избежание спонтанных ошибок тестирование каждого уха повторяли трижды.

Количественную оценку слуха проводили по методу Чуваева (2016) [4]. Каждое ухо оценивали отдельно, мощность звукового сигнала составляла 70 Дб. Достоверность полученных результатов оценивали с помощью критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Абсолютные значения количественной оценки слуха кошек для правого и левого уха представлены в Табл. 1.

Проведя статистическую обработку результатов, приведенных выше, мы получили среднестатистические значения нормы слуха для изученной группы кошек для левого и правого уха, а также усредненные данные по левому и правому уху вместе.

Левое ухо, п=14	Правое ухо, п=14	Левое и правое ухо вместе п=28
M=78.9 Me=80.5 σ = 26.97 Cv =34.2% м = 7.48	M=61.14 Me=58 σ = 19.2 Cv =31.4 2% м = 5.32	M=70,0 Me=71 σ = 24.68 Cv=35.39% м = 4.75

Результаты количественной оценки слуха кошек представлены в Таблице 2.

Как представлено в Таблице 2, у обследованной группы кошек, звуковая чувствительность левого и правого уха достоверно не отличалась и составляла в среднем для изученной популяции: 78.3±7.5 ед. и 61.1±5.3 ед. соответственно.

Объединяя и усредняя значения, полученные для правого и левого уха, мы получаем среднестатистическую норму слуха для одного уха изученной группы кошек: 70.0±4.8 ед., и эту норму можно принять за стопроцентный слух у кошек, во всяком случае для изученной выборки.

avvb_2021_03.indd 50 06.09.2021 7:52:21

Таблица 2

Норма слуха для одного уха и двух ушей у кошек (п=28)

Норма слуха по левому уху п=14	78.9±7.5
Норма слуха по правому уху п=14	61.1±5.3
Усредненная норма слуха по левому и правому уху п=28	70.0±4.8
Средняя норма слуха для кошки (оба уха) п=14	140±10

При проведении количественной оценки слуха у данной группы кошек, обращает на себя внимание факт довольно большого разброса данных – от 38 ед. до 140 ед. для одного уха или от 91 до 213 ед. суммарно для двух ушей (таб.1). Учитывая, что в данном исследовании кошки были разных пород, в том числе и беспородные, возможно, что такой разброс связан с породными особенностями, а именно – у одних пород слух более чуткий, чем у других. И если провести изучение нормы слуха для разных пород кошек, то возможно мы получим достоверные отличия по норме слуха для разных пород, как это было например у собак [5].

Ранее нами было показано, что норма слуха собак разных пород разная и составляет для одного уха [5]:

Английский сеттер (п=12) – 49.9 ± 3.6
Бобтейл (п=12) – 33.1 ± 2.3
Бультерьер (п=12) – 35.4 ± 2.2
Бультерьер мини (п=12) – 34.1 ± 2.3
Далматин (п=12) – 38 ± 3
Мексиканская голая (п=12) – 66.3 ± 6.4

Т.е. собаки породы мексиканская голая обладали самым чутким слухом среди собак изученных пород.

Данные, полученные нами для кошек (без дифференцировки попородно), составляют 70±4.8 ед. для одного уха. Таким образом можно говорить о том, что слух кошек сопоставим со слухом мексиканских голых и достоверно выше слуха всех других изученных пород собак, во всяком случае для изученных групп животных.

Выводы

1. У обследованных кошек, представителей разных пород, а также беспородных, достоверной разницы по звуковой чувствительности между правым и левым ухом не выявлено.

2. Средняя норма слуха для изученной группы кошек, составляет 70±4.8 ед. для одного уха.

Список литературы

1. Паджет Дж. Контроль наследственных болезней собак. / Дж Паджет. Пер. с англ. М.: «Софион», 2006. 280 с.

2. Чуваев И. В. Влияние различных факторов на проведение BAER-теста у собак, ошибки и артефакты. / И. В. Чуваев, А. С. Богданов // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2017, 1 (33), с. 39–45.

3. Чуваев И. В. Возможность использования метода вызванных слуховых потенциалов (BAER-test) для оценки качества лечения тугоухости у собак / И. В. Чуваев // Материалы 4-го Международного конгресса ветеринарных фармакологов и токсикологов «Эффективные и безопасные лекарственные средства в ветеринарии», СПб., 2016. С. 201–202.

4. Чуваев И. В. Количественная оценка остроты слуха у животных при проведении BAER-теста / И. В. Чуваев // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2016, 3 (31). С. 36–40.

5. Чуваев И. В. Норма слуха у здоровых собак различных пород / И. В. Чуваев // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2020, 1 (45). С. 48–53.

6. Greibrokk T. Hereditary deafness in the Dalmatian: Relationship to eye and coat color. / T. Greibrokk //Journal of the American Animal Hospital Association. 1994. V.30. P. 170–176.

7. Marshall A.E. Use of brainstem auditory evoked response to evaluate deafness in a group of Dalmatian dogs. / A. E. Marshall // J. of American Veterinary Medicine Ass. 1986. 188. № 7. P. 718–722.

8. Plonek M. A comparison of the brainstem auditory evoked response in healthy ears of unilaterally deaf dogs and bilaterally hearing dogs. / M. Plonek, J. Nicpoń, K. Kubiak, M. Wrzosek // Vet Res Commun. 2017 Mar;41(1):23–31

avvb_2021_03.indd 51 06.09.2021 7:52:21

ФАРМАКОЛОГИЯ

DOI 10.24412/2074-5036-2021-3-52-56
УДК 619:616.98:578.835.1
Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, медоносная пчела, восковая моль
Key words: Bacillus thuringiensis, honey bee, wax moth

Шульга И. С., Остякова М. Е., Лаврушина Л. А., Горбачёва И. Е., Адамова О. Г.

ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ *B. THURINGIENSIS* ПРОТИВ ВОСКОВОЙ МОЛИ

PREVENTIVE EFFICIENCY OF B. THURINGIENSIS-BASED DRUG AGAINST BEE MOTH

ФГБНУ «Дальневосточный зональный научно-исследовательский ветеринарный институт».
Адрес: 675005, Россия, г. Благовещенск, ул. Северная, д. 112.
Federal State Budgetary Scientific Institution Far East Zone Research Veterinary Institute.
Address: 675005, Russia, Blagoveshchensk, Severnaya St., 112.

Шульга Ирина Станиславовна, кандидат биологических наук, заведующая отделом микробиологии, вирусологии и иммунологии, dalznivilabmicro@mail.ru
Shulga Irina Stanislavovna, PhD of Biological Sciences, Head of Department of Microbiology, Virology and Immunology, dalznivilabmicro@mail.ru
Остякова Марина Евгеньевна, доктор биологических наук, доцент, директор, dalznivilabmicro@mail.ru
Ostyakova Marina Evgenievna, Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Director, dalznivilabmicro@mail.ru
Лаврушина Любовь Анатольена, научный сотрудник отдела микробиологии, вирусологии и иммунологии, dalznivilabmicro@mail.ru
Lavrushina Lyubov Anatolyevna, Researcher of Department of Microbiology, Virology and Immunology, dalznivilabmicro@mail.ru
Горбачёва Инна Евгеньевна, младший научный сотрудник отдела микробиологии, вирусологии и иммунологии, dalznivilabmicro@mail.ru
Gorbacheva Inna Evgenievna, Junior Researcher of Department of Microbiology, Virology and Immunology, dalznivilabmicro@mail.ru
Адамова Олеся Геннадьевна, младший научный сотрудник отдела микробиологии, вирусологии и иммунологии, dalznivilabmicro@mail.ru
Adamova Olesya Gennadyevna, Junior Researcher of Department of Microbiology, Virology and Immunology, dalznivilabmicro@mail.ru

Аннотация. Один из факторов, сдерживающих развитие пчеловодства, – это опасный вредитель пчелосемей – восковая моль (огневки). Личинки восковой моли способны жить в пчелиной семье и поедать все продукты, создаваемые пчелами, в результате пчеловодческим хозяйствам наносится значительный ущерб. Практический опыт применения экспериментального биологического препарата на основе штамма *B. thuringiensis RCAM 00045* в условиях пасек Амурской области дал основание для предположения, что препарат оказывает продолжительное профилактическое действие против восковой моли. Цель настоящей работы – провести оценку эффективности применения препарата против восковой моли на основе штамма *B. thuringiensis RCAM 00045* после профилактических обработок 2018 и 2019 гг. в условиях базового пчеловодческого хозяйства.

Полученные нами экспериментальные данные показывают, что состояние восковых рамок, подвергнутых обработке препаратом на основе B. thuringiensis в условиях базового пчеловодческого хозяйства оставалось неизменным. Признаки поражения восковой молью отсутствовали. Различий в сохранности рамок, обработанных в 2018 и в 2019 гг., нами выявлено не было. Сравнительное изучение инсектицидной активности препарата для лабораторной популяции гусениц восковой моли после обработок 2018 и 2019 гг. показало незначительную разницу в изменении активности препарата. Обработка, проведенная в 2019 г., была на 3,6 % эффективнее, чем в 2018 г. Разницу считаем несущественной, так как в условиях пасеки различий в сохранности рамок, обработанных в 2018 и в 2019 годах, выявлено не было. Однократная обработка экспериментальным препаратом на основе штамма *B. thuringiensis RCAM 00045* профилактирует появление восковой моли на пасеке и в местах хранения воскового сырья в течение двух сезонов после последней обработки в природно-климатических условиях Амурской области. Это позволяет нам рекомендовать к ежегодной обработке только вновь отстроенные пчелами восковые рамки в текущем году. Остальные восковые рамки, ранее обработанные препаратом, можно обрабатывать с интервалом один раз в два года.

Summary. *One of the most dangerous pests for bee colonies is the wax moth (Galleria mellonella). Wax moth larvae can live in a bee colony and consume all products produced by the bees, which significantly harms beekeeping. Practical experience of the application of an experimental biological drug based on the strain B. thuringiensis RCAM 00045*

avvb_2021_03.indd 52 06.09.2021 7:52:21

in the Amur Region apiaries showed that the drug exerts a positive preventive effect against wax moth. The present work was aimed to evaluate the efficiency of the drug based on the strain B. thuringiensis RCAM 00045 against wax moth after preventive treatments in 2018 and 2019 in the conditions of basic apiaries. The obtained experimental data showed that the condition of honeycomb bases treated with a drug based on the strain B. thuringiensis in the basic apiary remained unchanged. There were no signs of damage caused by the wax moth. There were no differences in the condition of honeycomb bases treated in 2018 and 2019. A comparative study of insecticide activity of the drug against a laboratory population of wax moth larva after the treatment with the studied drug in 2018 and 2019 showed an insignificant difference in the changes of the drug activity. The treatment performed in 2019 was 3.6% more effective than in 2018. This difference was insignificant because, in the conditions of the apiary, there were no differences in the preservation of honeycomb bases treated in 2018 and 2019. A single treatment with the tested drug based on the strain B. thuringiensis RCAM 00045 prevents the appearance of wax moth in the apiary and the places of wax products storage for two seasons after the last treatment in the natural and climatic conditions of the Amur Region. The study results provided grounds for the recommendation of annual treatment of new honeycomb bases made by bees in the current year. The rest honeycomb bases that were treated earlier can be treated once every two years.

Введение

Пчеловодство – древнейший промысел человека, на сегодняшний день является важной отраслью агропромышленного комплекса. Один из факторов, сдерживающих развитие пчеловодства, – это вредители пчелосемей. Опасным вредителем и постоянной заботой пчеловодов является восковая моль (огневки) [1].

Эволюционно сложилось, что личинки восковой моли способны жить в пчелиной семье и поедать все продукты, создаваемые пчелами. В результате поражения пчелосемей и запасов воскового сырья личинками восковой моли, пчеловодческим хозяйствам наносится значительный экономический ущерб [4, 8].

В Дальневосточном регионе климатические условия благоприятны для развития восковой моли, которая интенсивно размножается и паразитирует на пасеках, начиная с мая по август [7].

Борьбу с восковой молью осуществляют путем систематических осмотров пчелиных семей, механического уничтожения бабочек моли и их гусениц, а также с применением химических и биологических препаратов на основе *B. thuringiensis* [3, 8].

Серьезным преимуществом биологических препаратов в сравнении с химическими, является отсутствие загрязняющего фактора окружающей среды в результате их применения, а также безвредность для человека, животных и полезных насекомых, возможность использования, когда нельзя использовать химические препараты [2, 3, 6].

У нас имеется практический опыт применения экспериментального препарата на основе штамма *B. thuringiensis RCAM 00045* в условиях пасек Амурской области [7, 9, 10].

Целью настоящей работы было проведение оценки эффективности применения препарата против восковой моли на основе штамм *B. thuringiensis RCAM 00045* после профилактических обработок 2018 и 2019 гг. в условиях базового пчеловодческого хозяйства.

Материалы и методы исследований

Работа была выполнена в отделе микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБНУ ДальЗНИВИ и в условиях базовой пасеки, расположенной в Белогорском районе Амурской области, с. Низинное.

В процессе исследовательских работ в условиях частных пасек, возникло предположение, что после обработки соторамок препаратом на основе *B. thuringiensis* его профилактическое действие продолжается более одного года.

Для проверки этого предположения в условиях базовой пасеки в 2020 г. сравнивали биологическую эффективность двух последних профилактических обработок против восковой моли препаратом на основе *B. thuringiensis*, проведенных в 2018 и 2019 гг. после окончания медосбора. Обработке подвергли только новые рамки, отстроенные пчелами за летний период соответственно в 2018 г. и 2019 г. Обрабатывали сушь и кормовые медо-перговые рамки. Все рамки, обработанные препаратом, были промаркированы. Учет результатов проводили на основании ежемесячных осмотров состояния пчелосемей и воскового сырья в условиях его хранения.

avvb_2021_03.indd 53 06.09.2021 7:52:21

Кроме того, на пасеке были взяты образцы воскового сырья после обработок препаратом на основе *B. thuringiensis*, проведенных в 2018 и 2019 гг., для контроля инсектицидной активности в условиях лаборатории. Для этого вывели лабораторную популяцию личинок большой восковой моли.

Контроль инсектицидной активности препарата изучали в соответствии с методическими рекомендациями «Выделение и отбор высоковирулентных культур *Bacillus thuringiensis* вар. Galleria» [5].

Заражение личинок проводили перорально, методом свободного поедания воскового сырья, предварительно обработанного испытуемым препаратом. В первой опытной группе в качестве корма личинкам использовали вощину, обработанную препаратом на основе *B. thuringiensis* в 2018 г., во второй опытной группе – вощину, обработанную препаратом на основе *B. thuringiensis* в 2019 г., в контрольной группе личинкам скармливали необработанное восковое сырье. Вощину в количестве 3–5 г помещали в чашки Петри, подсаживали в каждую по 10 личинок восковой моли одного возраста. Для получения статистически достоверных данных эксперимент проведен в трех повторностях. Гибель гусениц учитывали в течение 10 суток. Всего в эксперименте использовано 90 гусениц лабораторной популяции *Galleria melonella*. Инсектицидную активность испытуемого препарата рассчитывали по формуле Аббота.

Результаты исследований и обсуждение

В результате регулярных ежемесячных осмотров в условиях базового хозяйства на протяжении весенне-летнего сезона 2020 г. установлено, что в пчелосемьях и в местах хранения запасов суши, состояние рамок, подвергнутых обработке препаратом на основе *B. Thuringiensis*, оставалось неизменным. Различий в сохранности рамок, обработанных в 2018 и в 2019 гг., нами не было выявлено. Признаки поражения восковой молью отсутствовали. Изменений в работе пчелиной семьи после установки в улей рамок, обработанных препаратом, нами замечено не было. Пчелы активно использовали соты как для сбора меда, так и для развития пчелиной семьи. Иногда встречались единичные особи бабочек восковой моли, при этом личинок моли и признаков их жизнедеятельности на обработанных рамках на протяжении всего наблюдаемого периода мы не находили. Вероятно, личинки восковой моли погибали на самых ранних стадиях своего развития, не успевая нанести видимого ущерба пчелосемьям.

Эксперимент по изучению инсектицидной активности препарата основе *B. thuringiensis* на личинках большой восковой моли в условиях лаборатории показал, что массовая гибель личинок в первой опытной и во второй опытной группах, где в качестве корма использовали вощину, обработанную препаратом в 2018 и 2019 гг., началась на второй-третий день после постановки эксперимента. В итоге оказалось, что после обработки 2018 г в первой и второй повторностях эксперимента гибель тест-объектов была 100 %-ной и в третьей повторности составила 90 %. Среднее значение инсектицидной активности препарата после обработки 2018 г. составило 96,6 % (Таблица 1.). Во второй опытной группе во всех трех повторностях мы наблюдали 100 %-ную гибель тест-объектов и соответственно 100 %-ную инсектицидную активность по Абботу.

В контроле личинки активно потребляли корм, были подвижны, по мере завершения цикла развития превращались в куколки, из которых впоследствии выводились бабочки большой восковой моли. Все тест-объекты в контроле выжили.

Сравнительное изучение инсектицидной активности препарата в условиях лаборатории после проведения профилактических обработок 2018 и 2019 гг. показывает незначительную разницу в изменении активности препарата. Обработка, проведенная в 2019 г., была на 3,6 % эффективнее, чем в 2018 г. Эта разница незначительна, тем более что в условиях пасеки различий в сохранности рамок, обработанных в 2018 и в 2019 годах, нами не было выявлено. Эксперимент доказывает высокую энтомопатогенную активность профилактических обработок, проведенных

avvb_2021_03.indd 54 06.09.2021 7:52:21

Таблица 1

Оценка инсектицидной активности экспериментального препарата основе *B. thuringiensis* (контроль после проведения профилактических обработок 2018 и 2019 гг.).

Группа	Повторность	Количество насекомых в опыте, шт.	Учет гибели за 10 суток, шт.	Инсектицидная активность по Абботу, %
Первая опытная	1	10	10	96,6
	2	10	10	
	3	10	9	
Вторая опытная	1	10	10	100,0
	2	10	10	
	3	10	10	
Контроль	1	10	0	-
	2	10	0	
	3	10	0	

против восковой моли в 2018 и в 2019 гг. в условиях базовой пасеки.

Полученные нами данные не совсем согласуются с немногочисленными результатами подобных экспериментов, опубликованными в обзоре зарубежными авторами [11], где отмечается, что обработка суспезией спор *B.thuringiensis* против восковой моли является эффективной в течение первого сезона, а во втором и в третьих сезонах смертность личинок значительно снижается. Это явление в статье объясняется тем, что на сотах со временем накапливается воск и прополис, что разбавляет содержание спор *B.thuringiensis*, либо «бактерии ухудшаются».

Мы можем согласиться с вышеупомянутым мнением исследователей. Но к сожалению не имеем возможность в достаточной мере сравнить данные результаты с результатами своих исследований, так как в статье нет ссылок на количественные характеристики гибели исследуемых объектов, температурно-климатические характеристики региона, где проводили эксперимент, ну и наконец, даже разные штаммы *B. thuringiensis* могут иметь разную энтомопатогенную активность в отношении личинок большой восковой моли.

Полученные нами экспериментальные данные показывают, что однократная обработка экспериментальным препаратом на основе штамма *B. thuringiensis RCAM 00045* позволяет профилактировать появление восковой моли на пасеке и в местах хранения воскового сырья в течение двух сезонов после последней обработки в природно-климатических условиях Амурской области. Это позволит сократить количество обрабатываемых рамок и рекомендовать к ежегодной обработке только вновь отстроенные пчелами восковые рамки в текущем году. Остальные восковые рамки, ранее обрабатывавшиеся препаратом, можно обрабатывать с интервалом один раз в два года.

Список литературы

1. Валиуллина Р. Р. Вредители медоносных пчел на территории Бурзянского района / Р. Р. Валиуллина // Экология и природопользование: прикладные аспекты. Матер. VII Междунар. науч.-практ. конф. Уфа: ООО «Аэтерна», 2017. С. 52–56.

2. Каменек Л. К. *Bacillus thuringiensis*: Механизм действия и пути использования: [моногр.] / Л. К. Каменек, Д. В. Каменек. Ульяновск: УлГУ, 2015. 198 с.

3. Кашина Г.В. Современные инсектициды против восковой моли / Г. В. Кашина // Пчеловодство. 2014. № 8. С. 26–28.

4. Керималиев Ж. К. Экологические факторы и меры борьбы с инвазионными болезнями пчел в Кыргызстане / Ж. К. Керималиев, К. М. Каракетов, С. С. Агаров // Вестник БГАУ. 2018. №1. С. 81–84.

5. Кольчевский А. Г. Выделение и отбор высоковирулентных культур *Bacillus thuringiensis var. galleriae*: методические рекомендации / А. Г. Кольчевский [и др.]; ВНИИ защиты растений. Л., 1987. 21 с.

6. Парамонова И. Е. Активный штамм *Bacillus thuringiensis* – продуцент белка δ–эндотоксина / И. Е. Парамонова, М. В. Фоменко, Д. С. Балпанов, О. А. Тен // Вестник Евразийского национального университета им. Л. Н. Гумилева. 2013. № 6. С. 262–269.

avvb_2021_03.indd 55 06.09.2021 7:52:21

7. Рекомендации по применению биоинсектицида «Антигаллерин» для борьбы с восковой молью / сост. И. С. Шульга, Д. А. Желябовская. Благовещенск: ФГБНУ ДальЗНИВИ, 2018. 18 [1] с. Компьютер. графика.

8. Шишканов А. В. Огневки (*Lepidoptera: Pyralidae*) как наиболее опасные вредители в пчеловодстве / А. В. Шишканов, Е. Б. Иванова, А. Г. Шалатилова // Прикладная энтомология. 2013. Т. 4. № 2(10). С. 10–14.

9. Шульга И. С. Сравнительная оценка эффективности препаратов против большой восковой моли / И. С. Шульга, Д. А. Желябовская, Л. А. Лаврушина, И. Е. Горбачёва // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2020. № 3 (47). С. 57–61. DOI: 10.24411/2074-5036-2020-10031.

10. Шульга И. С. Опытный препарат «Антигаллерин» против пчелиной огневки / И. С. Шульга, Д. А. Желябовская, М. Е. Остякова, Л. А. Лаврушина, И. Е. Горбачева // Тенденции развития науки и образования. 2018. № 36(2). С. 50–53.

11. Charles A. K. The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* / A. K. Charles, O. O. George, N. N. Paul, [et al.] // Insects. 2017. Vol. 8(2). P. 61. doi 10.3390/insects8020061.

Сканеры УЗИ “РАСКАН”

Достоверность, доступность и простота ультразвуковых исследований в ветеринарии

Все виды исследований у крупных, средних и мелких животных. УЗИ домашних и экзотических животных и птиц. Контроль стельности в животноводстве и продуктивности в птицеводстве

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

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

5,9 кг

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

3,7 кг

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

Организованы курсы ветеринарные УЗИ

НПП “РАТЕКС”

Производство сканеров УЗИ с 1991 года

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

avvb_2021_03.indd 56 06.09.2021 7:52:21

DOI 10.24412/2074-5036-2021-3-57-61
УДК: 619:616
Ключевые слова: пластическая ветеринарная хирургия, реверсивный лоскут, лоскут на артерии Сафена, аксиальный лоскут, ветеринарная хирургия, лечение ран у животных
Key words: plastic veterinary surgery, reversible flap, flap on the Saphen artery, axial flap, veterinary surgery, treatment of wounds in animals

[1]Смирнов И.А., [1]Гаранин Д.В., [1,3]Голуб Л.В., [1,2]Борисовская И.М.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ РЕВЕРСИВНОГО ЛОСКУТА НА АРТЕРИИ САФЕНА У 11 СОБАК

EXPERIENCE OF USING A REVERSIBLE FLAP ON THE SAPHEN ARTERY IN 11 DOGS

[1]Ветеринарный центр «БИОКОНТРОЛЬ», 115522, Москва, Каширское шоссе, дом 24, строение 10
[1]Veterinary center "BIOCONTROL", 115522, Moscow, sh. Kashirskoe, 24, bld. 10

[2]ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, Москва ул. Миклухо-Маклая, 8, корп. 2
[2]Peoples' Friendship University of Russia, 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya, 8., corp. 2,

[3]ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН,
115478, Москва, Каширское шоссе, д. 23.
*[3]Clinic of experimental therapy of FSBI "N.N. Blokhin Russian Cancer research Center" RAMS
115478, Moscow, sh. Kashirskoe, 23.*

И.А. Смирнов – ветеринарный врач- хирург ветеринарного центра «Биоконтроль». dazdranagon89@mail.ru.
Smirnov I. A. – the veterinary center "Biocontrol" veterinary surgeon. dazdranagon89@mail.ru
Д.В. Гаранин – кандидат биологических наук, ведущий ветеринарный врач-хирург
ветеринарного центра «Биоконтроль»
Garanin D. V. – Ph.D. of Biological Sciences, the veterinary center "Biocontrol" leading veterinary surgeon
Л.В. Голуб – ведущий ветеринарный врач-хирург ветеринарного центра «Биоконтроль»,
ветеринарный врач 1 категории ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина».
Golub L. V. – the veterinary center "Biocontrol" leading veterinary surgeon, the first category veterinarian of "National Medical Research Center of oncology named after N. Blokhin"
И.М. Борисовская – ассистент ветеринарного врача-хирурга ветеринарного центра «Биоконтроль»,
студентка 4 курса факультета ветеринарной медицины. sinica2019@mail.ru
Borisovskaja I.M. – the veterinary center "Biocontrol" Veterinary Surgery Assistant, the 4th-year student of the faculty of veterinary medicine. E-mail: sinica2019@mail.ru

Аннотация. В этом исследовании оценивалась техника реверсивного лоскута на артерии Сафена (Reverse saphenous conduit flap), используемая в ветеринарной пластической хирургии для закрытия ран предплюсны и плюсны. Из-за малого объема и низкой эластичности кожи в данных областях закрытие дефектов может быть весьма непростой задачей. Для её решения в ветеринарной хирургии используется реверсивный лоскут на артерии Сафена. Данный метод был успешно использован в 11 случаях у собак с раневыми дефектами дистальной части тазовой конечности. Нами оценивались степень приживаемости, осложнения и конечный результат. У всех одиннадцати пациентов были достигнуты отличные результаты по окончании лечения. У всех животных возникли те или иные осложнения, которые купировались в послеоперационном периоде. Грамотное использование методики реверсивного лоскута на артерии Сафена дает отличные результаты по реконструкции дефектов кожи и мягких тканей предплюсны и плюсны.

Summary. *This study evaluated the reverse flap technique on the Saphen artery (Reverse saphenous conduit flap), used in veterinary plastic surgery to close wounds of the tarsus and metatarsus. Due to the small volume and low elasticity of the skin in these areas, to close defects can be a very difficult task. To solve this problem, veterinary surgery uses a reversible flap on the Saphen artery. This method was effectively used in 11 cases in dogs with wound defects of the distal part of the pelvic limb. We evaluated the degree of survival, complications, and the final result. All eleven patients revealed excellent results at the end of treatment. All animals had certain complications that were eliminated in the postoperative period. Competent use of the reverse flap technique on the Saphen artery gives excellent results in the reconstruction of skin and soft tissue defects of the tarsus and metatarsus.*

avvb_2021_03.indd 57 06.09.2021 7:52:21

Введение

За последние несколько десятилетий совершен достаточно большой скачок в развитии пластической ветеринарной хирургии. Несмотря на это, реконструкция дефектов кожи и мягких тканей нижней трети голени, предплюсны и плюсневой области была и остается трудной задачей. Одним из решений данной проблемы является применение аксиальных лоскутов. Аксиальные лоскуты – это лоскуты, имеющие в своем составе прямые кожные артерии и вены, которые идут от сегментарных, осевых артерий или артериальных анастомозов; данные сосуды кровоснабжают обширные регионы кожи и имеют четкие анатомические ориентиры и название. Суть транспозиции лоскутов довольно проста – хирург переносит участок из так называемой донорской области, где кожи в избытке, в область дефекта с её недостатком (реципиентную зону).

Одним из таких лоскутов, представляющим особый интерес, является реверсивный лоскут на артерии Сафена (Reverse Saphenous Conduit Flap). Основная область его применения – закрытие дефектов кожи и мягких тканей предплюсны и плюсны. Трудность данной локализации заключается в ограниченном запасе кожи. [1, 2, 4, 9]. Из-за этого закрытие раны путем простого сведения ее краев в большинстве случаев невозможно [7]. Применение данного лоскута показало хорошие результаты для закрытия дефектов в дистальной части тазовых конечностей как у кошек, так и у собак [2, 4].

Реверсивный лоскут на артерии Сафена не является стандартным аксиальным лоскутом. В первую очередь из-за того, что осевая для лоскута артерия Сафена не является истинной прямой кожной артерией, а является крупной ветвью бедренной артерии. Во-вторых, кровоснабжение лоскута реверсивное, т. е. несмотря на то, что артерия и медиальная вена Сафена лигируются и пересекаются в их проксимальной части, адекватное кровоснабжение возможно за счет артериальных и венозных анастомозов с ветвями краниальной большеберцовой артерии, расположенных дистально в области скакательного сустава.

К сожалению, на данный момент нет опубликованной информации о клиническом применении данного аксиального лоскута в отечественной ветеринарной медицине. Поэтому целью данного исследования стало продемонстрировать его клиническую универсальность в лечении ран предплюсно-плюсневой области различного происхождения, описать возникшие осложнения и конечный результат.

Материалы и методы

Исследование проводили на базе ветеринарного центра «Биоконтроль». Были отобраны 11 собак разной весовой категории, разных пород, возрастом от 2 до 12 лет, которым применили данную технику закрытия дефекта в период с 2017 по 2020 год. В процессе обработки данных составлялась общая таблица, в которую вносились сведения о массе тела, породе животного, возрасте, диагнозе, осложнениях, проценте приживаемости лоскута и периоде наблюдения за пациентом.

Предоперационная подготовка

У 10 из 11 пациентов лоскут был применен для закрытия раны после иссечения новообразований в области предплюсны и плюсны. Поэтому все эти пациенты прошли стандартное предоперационное обследование для онкологических пациентов, которое как минимум включало: тонкоигольную биопсию новообразования, рентген грудной клетки, УЗИ брюшной полости, общий клинический и биохимический анализы крови, коагулограмму, эхокардиограмму.

Многие животные получали препараты в дооперационном периоде или проходили иное лечение. В частности, все собаки из данной выборки с диагнозом мастоцитома получали преднизолон в дозе от 0,5 до 1 мг на кг массы животного 1 раз в сутки до операции. Помимо этого, были пациенты, принимавшие амоксициллин + клавулановая кислота, иматиниб и фамотидин.

У многих животных присутствовали сопутствующие заболевания/патологии, такие как: сахарный диабет, брахицефалический синдром, новообразования яичников, опухоли молочных желёз, пояснично-крестцовый синдром, стероидный гепатит, ожирение, большинство из которых контролировалось лечением или было в стадии ремиссии на момент операции.

avvb_2021_03.indd 58 06.09.2021 7:52:21

Таблица 1

Применение реверсивного лоскута на a. Saphena с 2017 по 2020 год (ВК «Биоконтроль»)

Вид, порода	Возраст	Диагноз	Осложнения	Приживление лоскута	Период наблюдения
Собака, золотистый ретривер	12 лет	Мастоцитома	Выраженая эритема и отек лоскута в первые дни после операции, поверхностный некроз в дистальной части лоскута (заживление по вторичному натяжению)	**70%**	**16.02.2017 - ?**
Собака, бостон терьер	5 лет	высоко дифференцированная мастоцитома	Незначительная эритема и отёк лоскута	**100%**	**05.07.2018** – - 19.07.2018?
Собака, метис	6 лет	Плоскоклеточный рак	Несостоятельность швов в донорской зоне, потребовавшая пластики дефекта кожи лоскутом на каудальной поверхностной надчревной артерии	**100%**	**05.08.2018 - 04.01.2021**
Собака, метис	14 лет	высокодифференцированная саркома мягких тканей	Выраженая эритема и отек лоскута в первые дни после операции, поверхностный некроз в дистальной части лоскута (заживление по вторичному натяжению)	**70%**	**14.10.2018 - 31.10.2020**
Собака, хаски	10,5 лет	Саркома периваскулярного генеза	Выраженая эритема и отек лоскута в первые дни после операции, поверхностный некроз в дистальной части лоскута (заживление по вторичному натяжению)	**100%**	**28.05.2019 - 09.08.2019?**
Собака, метис	10,5 лет	Трихоэпителиома ?	Выраженая эритема и отек лоскута в первые дни после операции. Мацерация кожи дистальной части лоскута в области пяточного бугра	**100%**	**10.08.2019** – **09.09.2020 (эутаназия)** Местный рецидив опухоли через 2 мес
Собака, французский бульдог	6,5 лет	Гиподермальная мастоцитома	Умеренная эритема и отек лоскута. Краевой некроз кожи в донорской зоне без несостоятельности швов (заживление по вторичному натяжению)	**100%**	**08.11.2019 – 25.01.2021**
Собака, мопс	7 лет	Гиподермальная мастоцитома	Инфицирование раны, выраженный отек и эритема лоскута и дистальной части конечности, эпидермальный некроз в дистальной части лоскута с быстрой реэпителизацией	**100%**	**27.08.2020 – 19.02.2021**
Собака, метис	11 лет	Саркома периваскулярного генеза	Выраженая эритема и отек лоскута в первые дни после операции, поверхностный некроз в дистальной части лоскута с быстрой реэпителизацией	**100%**	**02.10.2020 – 19.02.2021**
Собака, немецкая овчарка	2 года	Травматическая ампутация дистальной части плюсны	Полнослойный некроз участка лоскута на фоне избыточного натяжения	**85%**	**03.12.2020 – 10.02.2021**
Собака, метис	8 лет	Гиподермальная мастоцитома	Незначительная эритема и отёк лоскута	**100%**	**22.12.2020 – 31.01.2021**

Операция

Все оперативные вмешательства были проведены тремя хирургами, имеющими высокий уровень квалификации и многолетний опыт работы, строго с соблюдением правил асептики и антисептики. Все пациенты были прооперированы согласно методике, описанной в публикациях Pavletic M. M. и актуальной книге этого же автора [5, 6, 7]. Помимо этого, в одном из случаев хирург прибег к дополнительной методике послабляющих разрезов для снижения избыточного натяжения в донорской области. В 6 случаях была осуществлена установка активного дренажа. В качестве шовного материала использовался PDS, полипропилен и капрон в зависимости от предпочтений хирурга, проводившего лечение.

Послеоперационный период

В послеоперационном периоде животные в обязательном порядке получали мультимодальное обезболивание рядом препаратов: мелоксикам, трамадол, ИПС лидокаина, нефопам, метамизол натрия, габапентин. Препараты назначались в зависимости от степени боли пациента. Также практически всем пациентам назначали ограничение подвижности с помощью наложения повязки Роберта-Джонса, уменьшения моциона и назначением медикаментозного сопровождения в отдельных случаях (габапентин, ИПС дексдомитора в первые сутки).

У ряда пациентов регистрировались осложнения в послеоперационном периоде. К ним относились все нежелательные послеоперационные явления, связанные с лоскутом и донорской зоной, кроме умеренного отека лоскута, эритемы и скопления серомы в раннем послеоперационном периоде, так как для данной операции это считалось нормой. [1, 5, 10]

Оценка результатов

Оценка исхода проводилась путем клинического обследования пациента во время послеоперационной госпитализации и при каждом

avvb_2021_03.indd 59 06.09.2021 7:52:21

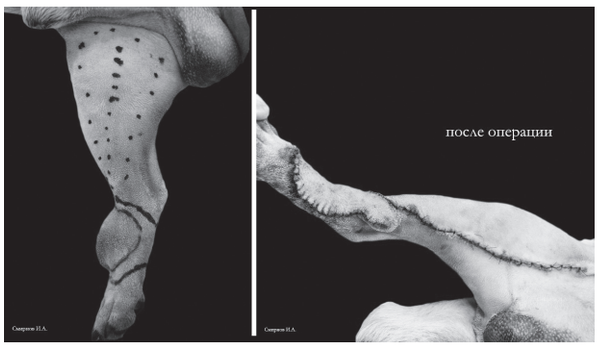


Рис. 1. Планирование операции и послеоперационный результат у мопса с диагнозом «гиподермальная мастоцитома».

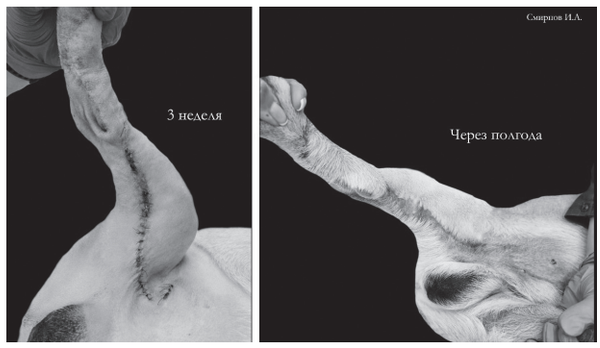


Рис. 2. Шов через 3 недели и 6 месяцев после операции

повторном приёме в отделении реабилитации или на приёме у хирурга. Послеоперационная область контролировалась до полного заживления. Клиническое обследование включало визуальную оценку лоскута и донорского участка (цвет, отек, консистенция, образование серомы, некроз и расхождение). Для долгосрочного контроля лечащий врач связывался с владельцами по телефону или через мессенджер.

Результаты исследования

Всего в период с 2017 по 2020 год методика аксиального лоскута на артерии Сафена была применена у 11 собак. Животные принадлежали к разным породам: золотистый ретривер, бостон-терьер, французский бульдог, немецкая овчарка, сибирский хаски, мопс и метисы. В выборке присутствовало 5 самок и 6 самцов возрастом от 2 до 12 лет. Вес животных варьировался от 14 до 38 кг.

10 пациентов были направлены на операцию с целью удаления новообразований в области предплюсны и плюсны. У данных пациентов были диагностированы такие новообразования, как мастоцитома, высокодифференцированная саркома мягких тканей, плоскоклеточный рак, трихоэпителиома, саркома периваскулярного генеза. Одному пациенту оперативное вмешательство требовалось для закрытия дефекта после частичной ампутации плюсны.

У всех животных перед операцией оценивались крупные сосуды тазовой конечности, в т. ч. медиальная а. и в. Сафена и кожа. Визуально ни у одной из собак не наблюдалось дефектов кожи или гематом в дистальной части оперируемой конечности.

В интраоперационном периоде осложнений не отмечалось. После операции животные находились первые дни в отделении реанимации и интенсивной терапии с дальнейшим переходом в отделение реабилитации. Все пациенты получали мультимодальное обезболивание. В ходе наблюдений за каждым лоскутом проводилась оценка его приживаемости. Результаты отображены в таблице. У 8 пациентов отмечалась приблизительно 100 % приживаемость, у 2 пациентов 70 % и у одного 85 %. Процентность высчитывалась путём измерения некротизированного участка и целого лоскута.

У всех пациентов примерно через 48 часов после операции развивались явления венозного застоя тканей лоскута, который проявлялись в виде умеренного или выраженного отека и эритемы лоскута, которые проходили самостоятельно в течение недельного срока. Данный факт не влиял на выживаемость лоскута, возможность расхождения швов или иную причину неприживления.

В итоге у всех животных были достигнуты отличные результаты по закрытию дефекта и все собаки имели опороспособность на оперированную конечность. На момент написания статьи одно животное эвтаназировали по причинам, не имевшим отношения к операции.

Осложнения возникли во всех случаях. Наиболее часто встречался поверхностный (эпидермальный) некроз в дистальной части лоскута (у 5 из 11 пациентов). Реэпителизация участков эпидермального некроза занимала около недели на фоне местных обработок. У 3 пациентов наблюдались осложнения в донорской области: два па-

avvb_2021_03.indd 60 06.09.2021 7:52:22

циента имели краевой некроз кожи в донорской области, который не потребовал повторной операции; а у 1 пациента наблюдалось расхождение швов в донорском участке, которое потребовало реконструкции дефекта аксиальным лоскутом на поверхностной надчревной артерии. Один пациент имел полнослойный участок некроза лоскута (около 15 %), который был связан с избыточным натяжением в концевой части лоскута. Дальнейшее заживление этого участка проходило по вторичному натяжению.

Заключение

Полученные нами результаты применения реверсивного лоскута на артерии Сафена позволяют говорить об высокой эффективности данной методики закрытия дефектов кожи и мягких тканей предплюсны и плюсны. Данный лоскут позволяет проводить одномоментное закрытие раны после иссечения новообразований, а также подходит для ран травматической этиологии.

Список литературы

1. Cornell K. Reverse Saphenous Conduit Flap in Cats: An Anatomic Study. / K. Cornell, K. Salisbury, S. Jakovljevic, M. Bauer, D. Petryk. // Veterinary Surgery, 1995, 24(3), 202–206. doi:10.1111/j.1532-950x.1995.tb01319.x

2. Elliott, R. C. Reverse saphenous conduit flap in small animals: Clinical applications and outcomes / R. C. Elliott // Journal of the South African Veterinary Association, 2014, 85(1), Art #1038, 4 pages. http:// dx.doi.org/10.4102/jsava.v85i1.1038

3. Budras K. D. Anatomy of the Dog: An Illustrated Text / K. D. Budras, P. H. McCarthy, W. Fricke, R. Richter, A. Horowitz, R. Berg. 5th ed. 2010.

4. Kostolich M. Axial Pattern Flap Based on the Genicular Branch of the Saphenous Artery in the Dog. / M. Kostolich, M. M. Pavletic // Veterinary Surgery, 1987, 16(3), 217–222. doi:10.1111/j.1532-950x.1987.tb00942.x

5. Pavletic M. M. DVM. Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery, / M. M. Pavletic. Third Edition, 2010, p. 421–429.

6. Pavletic M. M. Axial pattern flaps / M. M. Pavletic // M. M. Palvetic (ed.), Atlas of small animal reconstructive surgery, n.p., Saunders, Philadelphia, 1999.

7. Pavletic M. M., Watters, J., Henry, R.W. & Nafe, LA., Reverse saphenous conduit flap in the dog / M. M. Pavletic, J. Watters, R. W. Henry, L.A. Nafe, // Journal of the American Veterinary Medical Association, 1983, 182, 380–389.

8. Pavletic M. M. Canine axial pattern flaps, using the omocervical, thoracodorsal, and deep circumflex iliac direct cutaneous arteries. / M. M. Pavletic // Am J Vet Res 42:391–406, 1981

9. Pavletic M. M. Anatomy and circulation of the canine skin / M. M. Pavletic // Microsurgery, 1991, 12, 103–112. http://dx.doi.org/10.1002/micr.1920120210

10. John Williams and Alison Moores. Manual of Canine and Feline Wound Management and Reconstruction. 2nd Edition, 2009; P. 159–173

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 !!

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

DOI 10.24412/2074-5036-2021-3-62-67
УДК 636.033:637.074.
Ключевые слова: северные олени, мясная продуктивность, химический состав, калорийность, белковый качественный показатель.
Keywords: reindeer, meat productivity, chemical composition, calorie content, protein quality indicator.

Лайшев К. А., Южаков А. А., Мухачев А. Д.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И КАЛОРИЙНОСТЬ МЯСА ДОМАШНИХ СЕВЕРНЫХ ОЛЕНЕЙ

THE INFLUENCE OF VARIOUS FACTORS ON THE CHEMICAL COMPOSITION AND CALORIC CONTENT OF DOMESTIC REINDEER MEAT

ФГБУН «Санкт-Петербургский Федеральный исследовательский центр Российской академии наук», Санкт Петербург. Адрес: 196608, Россия, Санкт Петербург, Пушкин, Подбельского, 7
St. Petersburg Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg Address: 196608, Russia, St. Petersburg, Pushkin, Podbelsky, 7

Лайшев Касим Анверович, д. в. н., член-корр. РАН, главный научный сотрудник
Laishev Kasim Anverovich, Doctor of Veterinary Science, Corresponding Member of the RAS Chief Researcher, layshev@mail.ru
Южаков Александр Александрович, д.с.-х.н., главный научный сотрудник
Yuzhakov Alexander Alexandrovich, Doctor of Agricultural Sciences, Chief Researcher, alyuzhakov@yandex.ru.
Мухачев Анатолий Дмитриевич, д.с.-х.н., главный научный сотрудник
Mukhachev Anatoly Dmitrievich, Doctor of Agricultural Sciences, chief researcher

Аннотация. Проведено исследование общего химического состава, белкового качественного показателя (БКП) и энергетической ценности мяса домашних северных оленей. Важнейшими факторами, влияющими на химический состав, БКП и энергетическую ценность оленины являются возраст и упитанность животных. Кастрация самцов оказывает незначительное влияние на химический состав мяса: по сравнению с некастрированными сверстниками увеличивается процент сухого вещества и жира, соответственно содержание обменной энергии в мясе на 6 ккал в 100 г. Химический состав мяса оленей значительно зависит от их упитанности: с повышением упитанности в мясе уменьшается содержание влаги, зато возрастает содержание сухих веществ, в том числе жира; количество белка и зольных веществ уменьшается. С повышением упитанности возрастает калорийность мяса, так, у взрослых самцов разница между вышесредней упитанностью и нижесредней упитанностью составляет 70 ккал на 100 г мяса. Породная принадлежность оленей – достаточно заметный фактор влияния и требует дополнительного учета при выращивании оленей на мясо. Скрещивание оленей разных пород, пол животных и кормление комбикормом перед убоем оказывают незначительное влияние на показатели химического состава и калорийности оленины.

Summary. *The group method revealed the influence of the following factors: gender, age, fatness, breed, feeding. The study of the general chemical composition, protein quality index (PQI) and energy value of domestic reindeer meat was carried out. The most important factors affecting the chemical composition, PQI and energy value of venison are the age and body condition of the animals. The castration of males has a slight effect on the chemical composition of meat: in comparison with non-castrated peers, the percentage of dry matter and fat increases, therefore increasing the content of metabolic energy in meat by 6 kcal per 100 g. The chemical composition of deer meat significantly depends on their fatness: with an increase in fatness the moisture content decreases, but the dry matter content, including fat, increases; the amount of protein and ash substances decreases. It should be noted that with an increase in fatness, the calorie content of meat increases, so, in adult males, the difference between the above average fatness and the below average fatness is 70 kcal per 100 g of meat. The breed of a deer is a rather noticeable factor of influence and requires additional consideration when raising deer for meat. Crossbreeding of different breeds of reindeer, the sex of the animals and feeding with compound feed before slaughter have an insignificant effect on the indicators of the chemical composition and calorie content of reindeer meat. The most valuable cuts in the carcass of deer in terms of fat, protein and calorie content are the dorsal and sirloin parts.*

Введение

Главной отраслью традиционного природопользования Арктики следует считать оленеводство. Россия обладает самым крупным в мире стадом домашних северных оленей. От их выращивания получают экологически безопасное мясо, субпродукты и другую ценную продукцию. Необходимо отметить, что вся продукция, получаемая от северных оленей, экологически безопасна. Олени выпасаются вдали от крупных городов и автомобильных дорог, их не подкарм-

avvb_2021_03.indd 62 06.09.2021 7:52:22

Таблица 1

Химический состав (%) и калорийность оленины, говядины и баранины*

Показатель	Оленина	Говядина	Баранина
Сухое вещество	29,1	35,5	32,7
Белки	19,5	18,6	15,6
Жиры	8,5	16,0	16,3
Зола	1,0	0,9	0,8
К/калорий в 100 г	145	216	206

* [2]

ливают комбикормами, содержащими ГМО и синтетические антибактериальные препараты. Ареал обитания вида северного оленя (*Rangifer tarandus*) расположен на территориях с суровым арктическим климатом. Северный олень – исключительно пастбищное животное, в его рационе присутствуют лишайники, травы, кустарники, деревья, грибы – всего не менее 600 видов [12]. При этом он обладает уникальной особенностью на 80–90 % переваривать углеводистый состав лишайников. Другие копытные животные усваивают его не более, чем на 20 %.

Химический состав и энергетическая ценность мяса северного оленя изменяются в зависимости от возраста, пола, упитанности и сезона года [1, 8, 9, 15]. Установлена зависимость химического состава мяса от породного состава поголовья и кормления оленей [6, 14]

По международной классификации оленина относится к grass fed – мясу, выращенному на траве. В результате такого питания образуются уникальные диетические характеристики оленины: сравнительно с другими видами мяса низкое содержание жира при относительно высоком – белка, низкая калорийность (Табл. 1).

При выпасе оленей летом на побережье полярных морей рацион в значительной степени обогащается микро- и макроэлементами, содержащимися в прибрежной растительности и морской воде. Олени, не доходящие до моря, вынуждены искать иные источники солей: в почве, на солонцах, в соленой рыбе, человеческой моче и солевой подкормке. Корма в геохимических зонах, подверженных техногенным выбросам в атмосферу продуктов сжигания предприятий ТЭК, металлургического производства, горных выработок, имеют в своем составе избыток некоторых макро- и микроэлементов, что несомненно сказывается на химическом составе оленины.

Цель работы – изучить степень влияния различных факторов на химический состав и калорийность мяса домашних северных оленей.

Материал и методы

Исследования проводились на территории Ямало-Ненецкого автономного округа и Эвенкийского муниципального района Красноярского края в период промышленного убоя северных оленей (ноябрь-декабрь) в 2008–2012 гг.

Химический состав мышечной ткани северных оленей исследовали согласно действующим стандартам по определению: массовой доли белка – методом Кьельдаля (ГОСТ 25011-81 «Мясо и мясные продукты. Методы определения белка»), массовой доли жира – метод с использованием бинарных смесей (ГОСТ 23042-86 «Мясо и мясные продукты. Методы определения жира»). Определение влаги проводили методом определения массовой доли влаги путём высушивания в сушильном шкафу при температуре 150 ± 2 °С (ГОСТ 9793-74) и золы – методом сухого озоления в муфельной печи при 500–550 °С [3, 4, 5, 7].

В длиннейшей мышце спины определяли дополнительно аминокислоты триптофан (по Грехему и Смиту), оксипролин (по Неймену и Логену в модификации Вербицкого и Детерейджа). Белковый качественный показатель определяли по соотношению триптофана к оксипролину.

avvb_2021_03.indd 63 06.09.2021 7:52:22

Таблица 2

Химический состав и калорийность мяса северных оленей ненецкой породы (средняя упитанность), %

Животные	Вода	Зола	Жир	Белки			Калорийность 100 г, ккал
				Полноценные	Неполноценные	Общее кол-во	
Взрослые самки	74,21	1,04	2,86	16,40	0,15	16,55	116
Быки-кастраты	74,43	1,06	2,80	16,43	0,17	16,60	116
Взрослые самцы	75,33	1,09	2,51	16,68	0,15	16,83	110
Самцы 1,5 года	74,91	1,00	2,91	16,58	0,11	16,69	114
Самки 1,5 года	74,63	0,98	3,85	17,06	0,11	17,17	120
Телята-самцы	76,12	1,00	2,80	16,27	0,12	16,39	108
Телята-самки	76,38	0,98	2,80	16,38	0,12	16,50	107

Результаты и обсуждение

Возраст, пол, кастрация. Мясо телят по сравнению с мясом взрослых оленей, отличается большим содержанием влаги и белка, но меньшим содержанием жира (Табл. 2).

Обнаружен незначительный половой диморфизм по содержанию белка и жира: в 1,5-летнем возрасте и у взрослых животных самки превосходят самцов по доле жира в мясе, но незначительно уступают по содержанию белка. Кастрация самцов оказывает незначительное влияние на химический состав мяса: по сравнению с некастрированными сверстниками увеличивается процент сухого вещества и жира, соответственно содержание обменной энергии в мясе на 6 ккал в 100 г. Содержание общего белка выше у некастрированных самцов на 0,23 %.

Как известно, белки саркоплазмы и миофибрилл мяса животных имеют в своем составе незаменимые аминокислоты и не содержат аминокислоту оксипролин. В соединительной ткани белки неполноценны по аминокислотному составу (коллаген, эластин, ретикулин) и не содержат аминокислоту триптофан. Следовательно, по соотношению триптофана и оксипролина можно судить о биологической ценности белков мяса, соотношение данных аминокислот называется белковый качественный показатель (БКП), В нашем исследовании у оленей в 6-месячном возрасте содержание триптофана выше у самцов на 40 %, у самок – на 44 %, чем у 18-месячных животных (Рис. 1.).

Содержание оксипролина с возрастом у оленей уменьшается более чем в два раза. Вследствие этого БКП 18-месячных самцов превосходит БКП 6-месячных на 41 %, у самок соответственно на 18 %. Отсутствие в литературе сведений о соотношении содержания триптофана и оксипролина у взрослых оленей не позволяет провести сравнение с данной группой животных. Ранее было отмечено, что максимальный БКП наблюдается у 1,5-годовалых оленей и в значительной мере связан с упитанностью животных [14].

Порода. В северном оленеводстве существует 4 официально утвержденных породы:

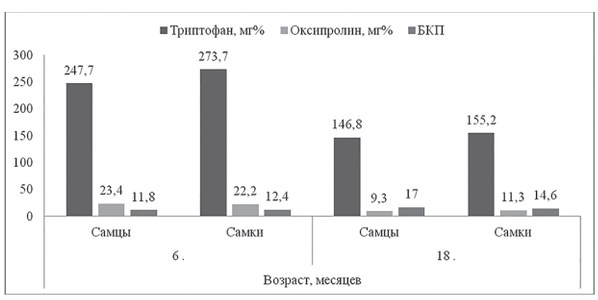


Рис. 1. Белковый качественный показатель мяса северных оленей.

Рис. 2. Химический состав и калорийность мяса оленей разных пород.

avvb_2021_03.indd 64 06.09.2021 7:52:22

ненецкая, эвенская, чукотская, эвенкийская. Изучение химического состава мяса северных оленей с учетом породы показало, что влаги больше в мясе оленей ненецкой и эвенской пород, меньше ее всего в мясе оленей чукотской породы (рис. 2). Эвенкийская порода по данному показателю занимает промежуточное положение между названными породами.

Сухого вещества больше в мясе оленей чукотской и эвенкийской пород. Меньше сухого вещества в мясе оленей ненецкой и эвенской пород. По содержанию белка больше его в мясе эвенских оленей, меньше всего белка в мясе эвенкийской породы, а мясо оленей ненецкой породы и чукотской породы занимают промежуточное значение между двумя названными породами.

Содержание жира наиболее высокое в мясе чукотской и эвенкийской пород, меньше его в мясе оленей эвенской породы. Мясо оленей ненецкой породы по данному показателю занимает промежуточное положение.

По содержанию золы (минеральному составу) мясо оленей чукотской породы стоит на первом месте, на втором месте мясо оленей эвенской породы. Незначительно по данному показателю им уступает мясо оленей ненецкой породы и эвенкийской породы.

По калорийности мяса результаты следующие (Ккал/100 г): самцы: 183 – чукотская; 171 – эвенкийская порода; 143 – ненецкая порода; 126 – эвенская порода. Соответственно с учетом породы по самкам имеем: 170; 175; 141; 142.

Упитанность. Убойных кондиций северные олени достигают в октябре-ноябре, тогда и проводится промышленный убой этих

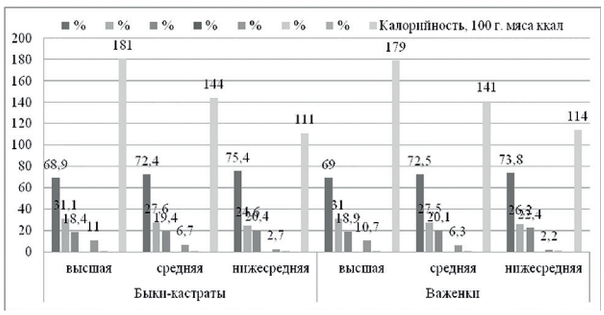


Рис. 3. Химический состав и калорийность мяса оленей разной упитанности.

животных. Как показали наши исследования, химический состав мяса оленей значительно зависит от их упитанности (Рис. 3).

Анализ результатов исследований показывает, что с повышением упитанности в мясе уменьшается содержание влаги, зато возрастает содержание сухих веществ, в том числе жира; количество белка и золеных веществ уменьшается. Количество воды и белка в мясе обратно пропорционально содержанию в нем жира, то есть с увеличением в мясе жира, количество воды и белка уменьшается. С повышением упитанности возрастает калорийность мяса. Так, у взрослых самцов разница между вышесредней упитанностью и нижесредней упитанностью составляет 70 ккал на 100 г мяса. Соответственно у взрослых самок – 65 ккал.

Межпородное скрещивание. При промышленном скрещивании чукотской и ненецкой пород оленей помеси первого поколения показали более высокие показатели роста, развития и мясной продуктивности при убое в 6 и 18 месяцев [14]. Существенной разницы в химическом составе мяса оленей различного происхождения не обнаружено (Табл. 3).

Таблица 3

Химический состав мяса оленей при межпородном скрещивании

Состав	Чукотско-ненецкие помеси				Чистопородные ненецкие			
	Самцы		Самки		Самцы		Самки	
	6	18	6	18	6	18	6	18
Вода	73,25	72,96	72,99	72,65	74,13	72,89	72,56	72,43
Белок	20,69	21,04	20,75	20,52	20,20	20,92	21,61	21,24
Жир	4,80	4,98	5,03	5,65	4,53	5,13	4,64	5,16
Зола	1,26	1,02	1,23	1,18	1,14	1,06	1,19	1,17
Ккал /100 г	130	133	132	137	125	133	132	135

avvb_2021_03.indd 65 06.09.2021 7:52:22

Таблица 4

Влияние карбамидно-минеральной подкормки северных оленей на биологическую ценность их мяса*

Биохимические показатели	Единицы измерения	Группы оленей	
		контрольная	опытная
Общая влага	%	76,69	75,07
Сухое вещество	%	23,31	24,93
Белки	%	17,34	18,03
полноценные	%	17,14	17,90
неполноценные	%	0,20	0,13
Жир	%	2,18	2,80
Зола	%	0,99	0,99
Азотистые экстративные вещества	%	1,81	2,50
Калорийность	Ккал /100 г	103	113
Общий азот	%	3,1341	3,2852
Остаточный азот	мг %	279,7	400,0
Аминный азот	мг %	71,22	67,63
Гликоген	мг %	515,57	804,15

*[8]

В мякоти чукотско-ненецких помесей содержалось несколько больше сухого вещества, жира, золы, чем в мясе сверстников ненецкой породы.

Подкормка оленей улучшает химический состав мяса. Например, подкормка оленей карбамидно-минеральной смесью (олени контрольной группы в сутки получали ягель и 15 г поваренной соли, олени опытной группы получали такое же количество ягеля, соли и дополнительно – 30 г карбамида, 15 г фосфата обесфторенного, 3 г калия углекислого, 5 г магния сернокислого, 5 г фосфата аммония, 2 г серы и 0,7 г микроэлементов) улучшает биологическую ценность оленьего мяса (Табл. 4).

В опыте по кормлению комбикормом в осенний период олени контрольной группы получали подснежный пастбищный корм, а животные опытной группы получали помимо подснежного пастбищного корма комбинированный корм с уровнем ОЭ 10,35 мДж/кг (2472 ккал/кг), сырой протеин 15,06 %, сырой клетчатки 8,14 % (опытная группа) [10]. Результаты качественной характеристики мяса в контрольной и опытной группах существенных различий не выявили, однако, в мясе животных опытной группы показатели белка были выше на 1,67 %, относительно контроля.

Показатели опыта соответствуют справочным данным химического состава российских продуктов питания [11], а также ветеринарно-санитарным требованиям, что позволяет рекомендовать его применение в пищевых целях без ограничений.

Части туши. Сравнение химического состава частей туши северных оленей при сортовом разрубе показало существенные различия между отрубами (табл. 5). Высокое содержание сухого вещества и жира обнаружено в спинной и филейной частях туши. Соответственно, они показали и самую большую калорийность мяса. В передней части туловища самыми калорийными оказались грудинка и пашина. Высокое содержание белка найдено в отрубах: зарез, огузок и голяшках передних и задних. Разница в содержании золы была незначительной. Общая проба мяса показала энергетическую ценность 187 ккал/100 г.

Заключение

Важнейшими факторами, влияющими на химический состав, БКП и энергетическую ценность оленины являются возраст и упитанность животных. БКП длиннейшей мышцы спины самый высокий у молодняка в 18-месячном возрасте. Породная при-

avvb_2021_03.indd 66 06.09.2021 7:52:22

Таблица 5

Химический состав частей туши взрослых северных оленей эвенкийской породы (высшая упитанность), %

Отрубы	Влага	Сухое вещество	Белок	Жир	Зола	Калорийность 100 г мяса, ккал.
Спинная часть	62,14	37,86	17,54	19,28	1,04	251
Задняя часть:						
филей	57,10	42,90	17,03	24,73	1,14	300
оковалок	66,50	33,50	19,07	13,33	1,10	102
кострец	66,58	33,42	18,63	13,64	1,15	203
огузок	73,28	26,72	20,48	5,17	1,07	127
Грудная часть	65,06	34,94	19,49	14,39	1,06	219
Лопаточная часть	72,08	27,92	19,50	7,32	1,10	148
Плечевая часть	72,91	27,09	20,18	5,72	1,19	136
Пашина	65,84	34,16	17,51	15,64	1,01	217
Зарез	67,23	32,77	23,53	7,94	1,30	170
Голяшка передняя	75,01	24,99	21,03	2,92	1,04	114
Голяшка задняя	74,41	25,59	20,74	3,76	1,09	120
Общая проба	67,57	32,43	19,97	11,33	1,13	187

надлежность оленей – заметный фактор влияния и требует его учета при выращивании оленей на мясо. Скрещивание оленей разных пород, пол животных, кастрация и кормление комбикормом перед убоем оказывают незначительное влияние на показатели химического состава и калорийности оленины. Самыми ценными отрубами в туше оленей по содержанию жира, белка и калорийности являются спинная и филейная части.

Список литературы

1. Абрамов, А. Ф. Пищевая ценность мяса оленей эвенской породы Якутии / А. Ф. Абрамов, Н. С. Роббек, Г. Н. Осипова // Достижения науки и техники АПК. 2010. № 10. С. 51–52.

2. Богдан Е. Г. Характеристика оленины. Исследование витаминного и жирно-кислотного состава мяса одомашненного северного оленя / Е. Г. Богдан, Е. Г. Туршук // Вестник МГТУ. 2016. Т. 19. № 4. С. 842–847.

3. ГОСТ 23042-86 «Мясо и мясные продукты. Методы определения жира»

4. ГОСТ 25011-81 «Мясо и мясные продукты. Методы определения белка».

5. ГОСТ 9793-74 «Продукты мясные. Методы определения влаги».

6. Григорьева М. Д. Содержание макро- и микроэлементов у двух пород домашних оленей колымской низменности / М. Д. Григорьева, С. В. Васильев, Н. Н. Сазонов // Инновации в современных конкурентных условиях: сб. ст. Междунар. науч.-практ. конф., 28 февраля 2015 г. Стерлитамак, 2015. С. 3–6.

7. Методические рекомендации по оценке мясной продуктивности и качества мяса крупного рогатого скота. М.: ВАСХНИЛ. 1990. 86 с.

8. Мухачев А. Д. Сравнительная характеристика мяса телят и взрослых оленей тундры / А. Д.Мухачев, Е. М. Ким //Науч.-техн. бюл. НИИСХ Крайнего Севера. 1972. №2(5). С. 8–9.

9. Мухачев, А. Д. Мясная продуктивность северных оленей / А. Д. Мухачев, Л. А. Колпащиков, К. А. Лайшев. Новосибирск. 2001. 97 с.

10. Новак Г. В. Химический состав мяса северных оленей при применении различных типов кормления / Г. В. Новак, Л. Ф. Бодрова // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2014. №6 (50). С. 120–122.

11. Петрова С. Химический состав мяса оленей / С. Петрова, Е. Алексеев // Ветеринария с.-х. животных. 2009. № 7. С. 64–66.

12. Скурихин И. М. Таблицы химического состава и калорийности российских продуктов питания. / И. М.Скурихин, В. А. Тутельян. М., 2007. 275 с.

13. Сыроечковский Е. Е. Северный олень. / Е. Е. Сыроечковский. М.: Агропромиздат, 1986. 256 с.

14. Южаков А. А. Качественные показатели мяса северных оленей Арктической зоны. / А. А. Южаков // Материалы VI Междун. форума «Продовольственная безопасность». СПб.-Пушкин. 2016. С. 153–157.

15. Hassan A. A. Level of selected nutrients in meat, liver, tallow and bone marrow from semi-domesticated reindeer (Rangifer t. tarandus L.) / A. A. Hassan, T. M. Sandanger, M. Brustad // International Journal of Circumpolar Health. 2012. Vol. 71. P. 179–197.

avvb_2021_03.indd 67 06.09.2021 7:52:22

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

avvb_2021_03.indd 68 06.09.2021 7:52:22