



ФГБУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ
ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ
И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ
(РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)

ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ

РУССКО-АНГЛИЙСКИЙ
ЖУРНАЛ

ISSN 2304-196X (Print)
ISSN 2658-6959 (Online)

VETERINARY SCIENCE TODAY

ДЕКАБРЬ | DECEMBER

№4 [35] 2020

RUSSIAN-ENGLISH JOURNAL

**Анализ распространения вируса ящура
типа Азия-1 в мире с 1999 по 2019 год** стр. 249

**К совершенствованию диагностики
туберкулеза крупного рогатого скота** стр. 261



**Показатели качества молока
высокопродуктивных коров на фоне
применения противомаститной вакцины**

стр. 255

**Выявление бактерий
Helicobacter suis у свиней
разных возрастных групп**

стр. 266

**Парвовирусный энтерит
собак: анализ эпизоотической
ситуации и перспективы**

стр. 283

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ
И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ
(РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)
ФГБУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ
ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»

ISSN 2304-196X (Print)
ISSN 2658-6959 (Online)

ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ

РУССКО-АНГЛИЙСКИЙ
ЖУРНАЛ

VETERINARY SCIENCE TODAY

ДЕКАБРЬ | DECEMBER

№4 [35] 2020

RUSSIAN-ENGLISH JOURNAL

Издается с 2012 года, выходит 4 раза в год

Published 4 times a year since 2012

Миссией издания является представление информации об основных направлениях развития ветеринарной науки и практики и привлечение внимания научных сообществ к актуальным проблемам и инновационным разработкам в области ветеринарии

The journal's mission is the delivery of information on basic development trends of veterinary science and practice and highlighting of vital issues and innovative developments in veterinary area for scientific community

Журнал «Ветеринария сегодня» включен в Перечень рецензируемых научных изданий (ВАК):

03.02.02 – Вирусология (ветеринарные науки),

06.02.02 – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология

с микотоксикологией и иммунология (ветеринарные науки)

Главный редактор: Метлин Артем Евгеньевич, доктор ветеринарных наук, заместитель директора по НИР и качеству ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: metlin@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-4283-0171
тел.: 8 (4922) 26-09-18

Шеф-редактор: Юлия Мелано, советник Руководителя Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор), г. Москва, Россия, e-mail: j.melano@ya.ru

Выпускающие редакторы:

Татьяна Никешина, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: nikeshina@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-0959-5915; Тел: 8(4922)26-15-12, доб. 22-27
Анастасия Мазнева, ООО «Да Винчи Медиа», г. Москва, Россия, e-mail: a.v.mazneva@gmail.com

Editor-in-Chief: Artem Ye. Metlin, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Deputy Director for Research and Quality, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: metlin@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-4283-0171
Tel.: 8 (4922) 26-09-18

Editorial Director: Julia Melano, Advisor to the Head of the Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance (Rosselkhoz nadzor), Moscow, Russia, e-mail: j.melano@ya.ru

Executive Editors:

Tatiana Nikeshina, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: nikeshina@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-0959-5915; Tel: 8 (4922) 26-15-12, ext. 22-27
Anastasia Mazneva, LLC "Da Vinci Media", Moscow, Russia, e-mail: a.v.mazneva@gmail.com

Редакционный совет журнала «Ветеринария сегодня»:

Болдбаатар Базарцэрэн — доктор ветеринарных наук, Институт ветеринарной медицины, г. Улан-Батор, Монголия

Бучацкий Л. П. — доктор биологических наук, профессор, Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев, Украина

Глотов А. Г. — доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБНУ «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий» РАН, г. Новосибирск, Россия; ORCID ID 0000-0002-2006-0196

Гринь С. А. — доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», г. Щелково, Россия

Забережный А. Д. — доктор биологических наук, профессор, ФГБНУ «Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко РАН», г. Москва, Россия; ORCID ID 0000-0001-7635-2596

Кузьмина Е. В. — доктор ветеринарных наук, Краснодарский научно-исследовательский ветеринарный институт — обособленное структурное подразделение ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии», г. Краснодар, Россия; ORCID ID 0000-0003-4744-0823

Ломако Ю. В. — кандидат ветеринарных наук, доцент, РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышеслесского», г. Минск, Беларусь; ORCID ID 0000-0002-9611-8286

Мищенко Н. В. — доктор биологических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Владимирский государственный университет им. А. Г. и Н. Г. Столетовых», г. Владимир, Россия; ORCID ID 0000-0002-3643-3129

Настасиевич Иван — доктор ветеринарных наук, Институт гигиены и технологии мяса, г. Белград, Сербия; ORCID ID 0000-0002-7141-269X

Недосеков В. В. — доктор ветеринарных наук, профессор, Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев, Украина; ORCID ID 0000-0001-7581-7478

Никитин И. Н. — доктор ветеринарных наук, ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана», г. Казань, Россия

Савченкова И. П. — доктор биологических наук, профессор, ФГБНУ «Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко», г. Москва, Россия; ORCID ID 0000-0003-3560-5045

Самарджия Марко — доктор ветеринарных наук, профессор, факультет ветеринарной медицины, Загребский университет, г. Загреб, Хорватия; ORCID ID 0000-0003-0402-3173

Сидорчук А. А. — доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА им. К. И. Скрябина», г. Москва, Россия

Соколович Марьяна — доктор ветеринарных наук, Хорватский ветеринарный институт, Центр птицеводства, г. Загреб, Хорватия; ORCID ID 0000-0003-3373-7415

Сулейманов С. М. — доктор ветеринарных наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет им. императора Петра I», г. Воронеж, Россия; ORCID ID 0000-0002-0461-9885

Федотов С. В. — доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА им. К. И. Скрябина» г. Москва, Россия

Эрдэнэбаатар Жанчивдорж — доктор ветеринарных наук, профессор, Институт ветеринарной медицины, г. Улан-Батор, Монголия

Editorial Council:

Boldbaatar Bazartsuren — PhD/DVM, Institute of Veterinary Medicine, Ulan Bator, Mongolia

Leonid P. Buchatsky — Doctor of Science (Biology), Professor, Institute of Fisheries of the National Academy of Agrarian Sciences, Kyiv, Ukraine

Alexander G. Glotov — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Siberian Federal Scientific Centre of Agro-Bio Technologies of the RAS, Novosibirsk, Russia; ORCID ID 0000-0002-2006-0196

Svetlana A. Grin — Doctor of Science (Biology), Professor, Corresponding Member of the RAS, FSBI "All-Russian Research and Technological Institute of Biological Industry", Schelkovo, Russia

Alexey D. Zaberezhny — Doctor of Science (Biology), Professor, FSBSI "Federal Scientific Centre VIEV", Moscow, Russia; ORCID ID 0000-0001-7635-2596

Elena V. Kuzminova — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Krasnodar Research Veterinary Institute — Detached Unit FSBS "Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine", Krasnodar, Russia; ORCID ID 0000-0003-4744-0823

Yuri V. Lomako — Candidate of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Research Republican Unitary Enterprise the Institute of Experimental Veterinary Medicine n. a. S. N. Vysheslisky, Minsk, Belarus; ORCID ID 0000-0002-9611-8286

Natalia V. Mishchenko — Doctor of Science (Biology), Associate Professor, Vladimir State University, Vladimir, Russia; ORCID ID 0000-0002-3643-3129

Ivan Nastasijevic — PhD/DVM, Institute of Meat Hygiene and Technology, Belgrade, Serbia; ORCID ID 0000-0002-7141-269X

Vitaly V. Nedosekov — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine; ORCID ID 0000-0001-7581-7478

Ivan N. Nikitin — Doctor of Science (Veterinary Medicine), FSBEI HE "Kazan State Academy of Veterinary Medicine n. a. N. E. Bauman", Kazan, Russia

Irina P. Savchenkova — Doctor of Science (Biology), Professor, FSBSI "Federal Scientific Centre VIEV", Moscow, Russia; ORCID ID 0000-0003-3560-5045

Marko Samardžija — PhD/DVM, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia; ORCID ID 0000-0003-0402-3173

Alexander A. Sidorchuk — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, FSBEI HE "Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MVA n. a. K. I. Skryabin", Moscow, Russia

Marijana Sokolovic — PhD/DVM, Croatian Veterinary Institute, Poultry Centre, Zagreb, Croatia; ORCID ID 0000-0003-3373-7415

Suleiman M. Suleymanov — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Honorary Scientist of the Russian Federation, Voronezh State Agrarian University n. a. Emperor Peter the Great, Voronezh, Russia; ORCID ID 0000-0002-0461-9885

Sergei V. Fedotov — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, FSBEI HE "Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MVA n. a. K. I. Skryabin", Moscow, Russia

Erdenebaatar Janchivdorj — PhD/DVM, Professor, Institute of Veterinary Medicine, Ulan Bator, Mongolia

Дизайн и верстка: Мария Бондарь

Ответственный секретарь: Елена Гусева

Корректор: Ирина Зверева

Журнал «Ветеринария сегодня» зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций, свидетельство о регистрации № ФС 77-49033 от 21 марта 2012 г.

Design and composition: Maria Bondar

Executive secretary: Elena Guseva

Proof-reader: Irina Zvereva

The Journal "Veterinary Science Today" is registered in the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology, and Mass Media Federal Service, Registration Certificate No FS 77-49033, March 21, 2012.

Научный журнал «Ветеринария сегодня» включен в информационно-аналитическую систему РИНЦ, каталог журналов открытого доступа DOAJ, а также в список журналов, входящих в базу данных RSCI на платформе Web of Science, и международную базу данных EBSCO. Электронные версии журнала размещаются в полнотекстовом формате на сайте Научной электронной библиотеки (НЭБ) eLIBRARY.RU, в каталоге DOAJ и по адресу <http://veterinary.arriah.ru/jour/index>. Зарегистрированный товарный знак, свидетельство № 514190.

Scientific Journal "Veterinary Science Today" is included in the information analysis system — Russian Science Citation Index, Directory of Open Access Journals DOAJ, as well as in the Web of Science RSCI database and in the international database of EBSCO. Full-text e-versions of the Journal are published on the website of the Scientific Electronic Library, eLIBRARY.RU, DOAJ, and <http://veterinary.arriah.ru/jour/index>. Registered trademark, certificate No. 514190.

Редакционная коллегия журнала «Ветеринария сегодня»:

Василевич Ф. И. — доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА им. К. И. Скрябина», г. Москва, Россия; ORCID ID 0000-0003-0786-5317

Власов Н. А. — доктор биологических наук, профессор, г. Москва, Россия

Груздев К. Н. — доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; ORCID ID 0000-0003-3159-1969

Гулюкин М. И. — доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, ФГБНУ «Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко», г. Москва, Россия; ORCID ID 0000-0002-7489-6175

Иголкин А. С. — кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; ORCID ID 0000-0002-5438-8026

Ирза В. Н. — доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; ORCID ID 0000-0001-7489-1772

Кононов А. В. — кандидат ветеринарных наук, заместитель директора по НИР и развитию, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; ORCID ID 0000-0002-5523-3261

Красочко П. А. — доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор, УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Беларусь; ORCID ID 0000-0002-4641-4757

Макаров В. В. — доктор биологических наук, профессор, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», г. Москва, Россия; ORCID ID 0000-0002-8464-6380

Мищенко В. А. — доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; ORCID ID 0000-0003-3751-2168

Плющиков В. Г. — доктор сельскохозяйственных наук, профессор, директор Аграрно-технологического института, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», г. Москва, Россия

Пронин В. В. — доктор биологических наук, профессор, руководитель центра доклинических исследований, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; ORCID ID 0000-0002-6240-3062

Прохватилова Л. Б. — кандидат биологических наук, доцент, начальник отдела координации НИР, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; ORCID ID 0000-0002-9560-0724

Прунтова О. В. — доктор биологических наук, профессор, главный эксперт, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; ORCID ID 0000-0003-3143-7339

Русалеев В. С. — доктор ветеринарных наук, профессор, ученый секретарь, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; ORCID ID 0000-0002-4972-6326

Сисягин П. Н. — доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН, Нижегородский научно-исследовательский ветеринарный институт — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», г. Нижний Новгород, Россия; ORCID ID 0000-0003-1085-220X

Старов С. К. — кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник, ведущий эксперт по качеству (заместитель главного редактора), ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия

Субботин А. М. — доктор биологических наук, профессор, Заместитель Премьер-министра Республики Беларусь, г. Минск, Беларусь

Чвала И. А. — кандидат ветеринарных наук, заместитель директора по НИР и мониторингу, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; ORCID ID 0000-0002-1659-3256

Шахов А. Г. — доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии», г. Воронеж, Россия; ORCID ID 0000-0002-6177-8858

Шкуратова И. А. — доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор, ФГБНУ «Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения РАН», г. Екатеринбург, Россия; ORCID ID 0000-0003-0025-3545

Editorial Board:

Fyodor I. Vasilyevich — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Academician of the Russian Academy of Sciences, Professor, FSBEI HE "Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MVA n. a. K. I. Skryabin", Moscow, Russia; ORCID ID 0000-0003-0786-5317

Nikolai A. Vlasov — Doctor of Science (Biology), Professor, Moscow, Russia

Konstantin N. Gruzdev — Doctor of Science (Biology), Professor, Chief Researcher, FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; ORCID ID 0000-0003-3159-1969

Mikhail I. Gulyukin — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Honorary Scientist of the Russian Federation, FSBSI "Federal Scientific Centre VIEV", Moscow, Russia; ORCID ID 0000-0002-7489-6175

Alexey S. Igolkin — Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of the Reference Laboratory, FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; ORCID ID 0000-0002-5438-8026

Victor N. Irza — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Chief Expert, FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; ORCID ID 0000-0001-7489-1772

Alexander V. Kononov — Candidate of Science (Veterinary Medicine), Deputy Director for Research and Development, FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; ORCID ID 0000-0002-5523-3261

Petr A. Krasochko — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Doctor of Science (Biology), Professor, EE "The Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine", Vitebsk, Belarus; ORCID ID 0000-0002-4641-4757

Vladimir V. Makarov — Doctor of Science (Biology), Professor, RUDN University, Moscow, Russia; ORCID ID 0000-0002-8464-6380

Vladimir A. Mischenko — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Chief Researcher, FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; ORCID ID 0000-0003-3751-2168

Vadim G. Plyuschnikov — Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Director of Agrarian and Technological Institute, RUDN University, Moscow, Russia

Valery V. Pronin — Doctor of Science (Biology), Professor, Head of the Centre for Preclinical Tests FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; ORCID ID 0000-0002-6240-3062

Larisa B. Prokhvatilova — Candidate of Science (Biology), Associate Professor, Head of the Department for Research Coordination, FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; ORCID ID 0000-0002-9560-0724

Olga V. Pruntova — Doctor of Science (Biology), Professor, Chief Expert, FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; ORCID ID 0000-0003-3143-7339

Vladimir S. Russaleyev — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Scientific Secretary, FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; ORCID ID 0000-0002-4972-6326

Pavel N. Sisyagin — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Associate Member of the Russian Academy of Sciences, Nizhny Novgorod Research Veterinary Institute — Branch of Federal Research Center for Virology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia; ORCID ID 0000-0003-1085-220X

Sergey K. Starov — Candidate of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Leading Quality Assurance Expert (Deputy Editor-in-Chief), FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia

Alexander M. Subbotin — Doctor of Science (Biology), Professor, Deputy Prime Minister of the Republic of Belarus, Minsk, Belarus

Ilya A. Chvala — Candidate of Science (Veterinary Medicine), Deputy Director for Research and Monitoring, FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; ORCID ID 0000-0002-1659-3256

Alexey G. Shakhov — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Associate Member of the Russian Academy of Sciences, SSI "All-Russian veterinary research institute of pathology, pharmacology and therapy", Voronezh, Russia; ORCID ID 0000-0002-6177-8858

Irina A. Shkuratova — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Associate Member of the Russian Academy of Sciences, Director, FSBSI "Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre, Ural Branch of RAS", Yekaterinburg, Russia; ORCID ID 0000-0003-0025-3545

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ | ЯЩУР

- 249** Анализ распространения вируса ящура типа Азия-1 в мире с 1999 по 2019 год
С. А. Куников, С. Н. Фомина

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БОЛЕЗНИ КРС

- 255** Показатели качества молока высокопродуктивных коров на фоне применения противомаститной вакцины
М. Н. Исакова, У. В. Сивкова, М. В. Ряпосова, И. А. Шкуратова, А. В. Лысов
- 261** К совершенствованию диагностики туберкулеза крупного рогатого скота
М. О. Баратов

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ

- 266** Выявление бактерий *Helicobacter suis* у свиней разных возрастных групп
Ф. М. Нурғалиев

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БОЛЕЗНИ ПТИЦ

- 272** Эффективность комплексного препарата на основе вторичных растительных ресурсов при микотоксикозе сельскохозяйственной птицы
Е. В. Кузьминова, Е. П. Долгов, М. П. Семенов, П. В. Мирошник
- 277** Перспективы применения бетулина в бройлерном птицеводстве
М. В. Новикова, И. А. Лебедева, Л. И. Дроздова, А. В. Бюлер

ОБЗОРЫ | БОЛЕЗНИ МЕЛКИХ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ

- 283** Парвовирусный энтерит собак: анализ эпизоотической ситуации и перспективы
Т. С. Галкина, А. К. Караулов

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

- 290** Определение родового состава грибов и общей токсичности кормов, произведенных на территории Республики Крым
С. С. Ибрагимова, О. В. Прунтова, С. И. Данильченко, Е. С. Ерофеева

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БИОТЕХНОЛОГИЯ

- 298** Получение immortalized культуры клеток почки кролика
Б. Л. Манин, И. В. Вологина, Е. А. Трофимова
- 304** Определение концентрации 146S частиц вируса ящура спектрометрическим способом при оценке количества вирусной РНК
М. И. Доронин, Д. В. Михалишин, В. А. Стариков, Д. А. Лозовой, Ю. С. Елькина, А. В. Борисов

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | ОБЩИЕ ВОПРОСЫ

- 313** Исследование лечебного действия термальной воды района Афонкарахисар на экспериментально индуцированный нефрит у мышей
Bülent Elitok, Yasin Agilou, Yavuz Ulusoy, Bahadır Kiliç

РЕЦЕНЗИИ

- 322** Рецензия на монографию «Африканская чума свиней в условиях особо охраняемых природных территорий (опыт Воронежского заповедника)». Б. В. Ромашов, Н. Б. Ромашова, Е. А. Стародубцева, А. С. Мишин. Воронеж: Издательско-полиграфический центр «Научная книга», 2019. 120 с. ISBN 978-5-4446-1236-1

НОВОСТИ

- 324** Публикации сотрудников ФГБУ «ВНИИЗЖ» в зарубежных научных журналах за 2018–2020 гг., включенных в международные реферативные базы данных и системы цитирования. Тема: «Заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота»

CONTENTS

REVIEWS | FOOT-AND-MOUTH DISEASE

- 249** Analysis of Asia-1 foot-and-mouth disease global spread in 1999–2019
S. A. Kunikov, S. N. Fomina

ORIGINAL ARTICLES | BOVINE DISEASES

- 255** Quality profile of milk from high producing dairy cows vaccinated against mastitis
M. N. Isakova, U. V. Sivkova, M. V. Ryaposova, I. A. Shkuratova, A. V. Lysov
- 261** Improvement of bovine tuberculosis diagnosis
M. O. Baratov

ORIGINAL ARTICLES | PORCINE DISEASES

- 266** Detection of *Helicobacter suis* bacteria in pigs of different age groups
F. M. Nurgaliev

ORIGINAL ARTICLES | AVIAN DISEASES

- 272** Efficacy of a complex plant-based preparation for poultry mycotoxicosis
E. V. Kuzminova, E. P. Dolgov, M. P. Semenenko, P. V. Miroshnichenko
- 277** Prospects of betulin application in broiler farming
M. V. Novikova, I. A. Lebedeva, L. I. Drozdova, A. V. Byuler

REVIEWS | DISEASES OF SMALL PETS

- 283** Canine parvovirus enteritis: epidemic situation analysis and perspectives
T. S. Galkina, A. K. Karaulov

ORIGINAL ARTICLES | VETERINARY MICROBIOLOGY

- 290** Determination of fungal genera composition and total toxicity of feed produced in the Republic of Crimea
S. S. Ibragimova, O. V. Pruntova, S. I. Danilchenko, Ye. S. Erofeeva

ORIGINAL ARTICLES | BIOTECHNOLOGY

- 298** Preparation of rabbit kidney immortalized cell culture
B. L. Manin, I. V. Volodina, Ye. A. Trofimova
- 304** Determination of FMDV 146S particle concentration by spectrometric method during viral RNA quantification
M. I. Doronin, D. V. Mikhailishin, V. A. Starikov, D. A. Lozovoy, Yu. S. El'kina, A. V. Borisov

ORIGINAL ARTICLES | GENERAL ISSUES

- 313** Investigation of healing effects of Afyonkarahisar Region thermal spring water on experimentally-induced nephritis in mice
Bülent Elitok, Agilou Yasin, Yavuz Ulusoy, Bahadır Kiliç

PEER REVIEWS

- 322** Peer-review of monograph "African swine fever in strict nature reserves (case study of Voronezh nature reserve)". B. V. Romashov, N. B. Romashova, E. A. Starodubtseva, A. S. Mishin. Voronezh: Publishing and polygraphic center "Science Book", 2019. 120 p. ISBN 978-5-4446-1236-1

NEWS

- 324** Publications of the FGBI "ARRIAH" researchers in foreign journals included in the abstract and citation databases, 2018–2020. Subject: "Lumpy skin disease"

Анализ распространения вируса ящура типа Азия-1 в мире с 1999 по 2019 год

С. А. Куников¹, С. Н. Фомина²

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ ORCID 0000-0002-1237-825X

² ORCID 0000-0002-2122-9096, e-mail: fomina@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Несмотря на принимаемые меры профилактики, направленные на предупреждение возникновения ящура, вспышки заболевания ежегодно регистрируют в различных странах мира. Ящур имеет тенденцию к широкому распространению и приобретению размаха эпизоотий. Являясь по современной классификации МЭБ/ФАО трансграничной инфекцией, ящур оказывает крайне негативное влияние на экономику и международную торговлю. В статье представлен анализ данных по распространению в мире в 1999–2019 гг. ящура, вызванного вирусом типа Азия-1. Наиболее часто вирус данного типа регистрируется на территории таких азиатских стран, как Афганистан, Пакистан, Китай, Непал, Иран, Мьянма, откуда он может распространяться в свободные от ящура страны. В Китае вспышки заболевания ящуром типа Азия-1 регистрировались с 2001 по 2009 г. Ранее считавшийся экзотическим для нашей страны, вирус этого типа был впервые зарегистрирован в 2005–2006 гг. на территории Приморского, Хабаровского, Забайкальского краев и Амурской области. Как показали результаты филогенетического анализа полученных изолятов, возникновение ящура в субъектах Российской Федерации было обусловлено заносом вируса из сопредельных территорий. Вероятный занос вируса из Китая привел к значительным экономическим затратам на ликвидацию ящура и недопущение дальнейшего распространения заболевания. Учитывая тесные торгово-экономические связи Российской Федерации с государствами Азиатско-Тихоокеанского региона, где основными партнерами являются Китай, Индия, Япония и Республика Корея, следует уделять повышенное внимание риску заноса вируса ящура из этих стран на территорию нашей страны. Важную роль играет укрепление международного сотрудничества со странами Азии с целью принятия совместных мер по обеспечению благополучия по ящуру.

Ключевые слова: вирус ящура, тип Азия-1, восприимчивые животные, вспышка инфекции, занос вируса, распространение болезни.

Для цитирования: Куников С. А., Фомина С. Н. Анализ распространения вируса ящура типа Азия-1 в мире с 1999 по 2019 год. *Ветеринария сегодня*. 2020; 4 (35): 249–254. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-249-254.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Фомина Светлана Николаевна, кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией диагностики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: fomina@arriah.ru.

UDC 619:616.98:578.835.2(100)

Analysis of Asia-1 foot-and-mouth disease global spread in 1999–2019

S. A. Kunikov¹, S. N. Fomina²

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ ORCID 0000-0002-1237-825X

² ORCID 0000-0002-2122-9096, e-mail: fomina@arriah.ru

SUMMARY

In spite of current foot-and-mouth disease (FMD) preventive measures, the disease outbreaks are annually reported in different countries of the world. FMD tends to extensive spread and growing into epidemics. While being a transboundary infection according to the OIE/FAO classification, FMD severely affects the economy and international trade. The paper describes the analysis of the data on global spread of Type Asia-1 virus-induced FMD in 1999–2019. The virus of this type is most often reported in such Asian countries as Afghanistan, Pakistan, China, Nepal, Iran, Myanmar, from where it can spread to FMD free countries. In China, Asia-1 FMD outbreaks were reported from 2001 to 2009. Previously exotic for our country, the virus of this type was first reported in the Primorsky, Khabarovsk, Zabaikalsky Krai and Amur Oblast in 2005–2006. The results of the phylogenetic analysis of the recovered isolates demonstrated that FMD emergence in the Subjects of the Russian Federation was attributed to the virus introduction from the neighboring territories. Possible virus introduction from China resulted in significant economic expenditures on FMD containment and eradication. In view of the close trade and economic relations between the Russian Federation and such Asia-Pacific countries as China, India, Japan and Republic of Korea, one should place greater focus on the risk of FMDV introduction into the Russian Federation from these countries. Of key importance is intensification of the international cooperation with the Asian countries in the area of joint activities aimed at FMD freedom maintenance.

Key words: foot-and-mouth disease virus (FMDV), type Asia-1, susceptible animals, outbreak, virus introduction, disease spread.

For citation: Kunikov S. A., Fomina S. N. Analysis of Asia-1 foot-and-mouth disease global spread in 1999–2019. *Veterinary Science Today*. 2020; 4 (35): 249–254. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-249-254.

Conflict of interests: The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Svetlana N. Fomina, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Laboratory for Foot-and-Mouth Disease Diagnosis, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: fomina@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Ящур является высококонтагиозным заболеванием парнокопытных животных, крайне негативно влияющим на экономическую ситуацию в странах мира. Иммунизация восприимчивого поголовья в районах высокой степени риска заноса и распространения ящура противоящурными вакцинами является основным методом профилактики заболевания [1, 2]. Сложность борьбы с заболеванием заключается в разнообразии серотипов вируса (типы А, О, С, Азия-1, SAT-1, SAT-2, SAT-3), его генетической изменчивости, а также узкой специфичности иммунитета у животных в пределах одного серотипа. На данный момент в мире существует ряд государств, где ящур эндемичен. Ситуация по ящуру в мире чрезвычайно нестабильна, и, несмотря на все принимаемые меры профилактики, случаи возникновения очагов болезни в различных странах регистрируются ежегодно [3].

В связи с угрозой возникновения на территории России вируса ящура типа Азия-1, особенно в регионах на границе с Китаем, Монголией, со странами Средней Азии и Закавказья, целью работы был анализ отечественной и зарубежной литературы о распространении вируса данного типа в мире в 1999–2019 гг.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализ зарегистрированных вспышек ящура в мире был проведен на основе открытых публикаций баз данных Всемирной референтной лаборатории по ящуру (WRLFMD, Пирбрайт, Великобритания) и Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ) [4–6].

В процессе анализа эпизоотической ситуации по ящуру типа Азия-1 были применены методы сравнительно-исторического и сравнительно-географического описания.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Вирус ящура серотипа Азия-1 эндемичен для Азиатского региона и был впервые выявлен из патологического материала, поступившего во Всемирную референтную лабораторию по ящуру в Пирбрайте из Пакистана в 1954 г. При ретроспективных исследованиях некоторых атипичных изолятов из индийского города Izzatnagar 1951–1952 гг. было установлено, что они относятся к серотипу Азия-1 и являются самыми ранними задокументированными изолятами вируса ящура данного типа. В 1957 г. ящур типа Азия-1 был занесен на Ближний Восток, где первые вспышки были зарегистрированы в Израиле. В дальнейшем данный серотип получил широкое распространение в мире [7–9].

В сентябре 1999 г. ящур типа Азия-1 получил значительное распространение в Иране, а в октябре того же года был зарегистрирован в Турции. Затем в 2000–2001 гг. был занесен в Армению, Грузию, Грецию и Азербайджан, а в 2003 г. – и в Таджикистан. В 2001–2005 гг. вспышки ящура данного типа отмечали также в Афганистане, Бутане, Индии, Китае, Лаосе, Монголии, Мьянме, Непале, Пакистане, Таиланде. На территории Вьетнама в 2006 г. произошла вспышка ящура в провинции Ha Giang. В январе 2007 г. на территории Северной Кореи в провинции P'yŏngyang-si (Ryongkok-Ri, Sangwŏn-gun) у телят, импортированных из китайской провинции Ляонин, были обнаружены клинические признаки ящура. В Китае первые сообщения о ящуре типа Азия-1 поступили из Гонконга 9 марта 2005 г., где были выявлены клинические признаки заболевания у крупного рогатого скота. Затем инфекция была зарегистрирована еще в семи провинциях. В 2006 г. в стране было отмечено 16 вспышек ящура данного типа, в 2007 г. – 8 вспышек, в 2008 г. – 3 вспышки. Отдельно следует отметить, что в 2007 г. в Синьцзян-Уйгурском автономном районе, расположенном на северо-западе Китая и граничащем с Казахстаном, Таджикистаном, Киргизией, Монголией и Российской Федерацией, были обнаружены носители вируса ящура типа Азия-1 среди крупного рогатого скота. В данном автономном районе вспышки болезни отмечались также в феврале 2008 г. и январе 2009 г. Этот же тип вируса ящура был обнаружен и в других провинциях Китая: Сычуань, Хунань, Гуйчжоу и Шэньси [10, 11]. В 2009–2011 гг. ящур типа Азия-1 новой генетической линии Sindh-08 получил широкое распространение в Пакистане, Бахрейне, Иране, Афганистане, был выделен в 2011 г. на территории Турции в Восточной Анталии [8]. В мае 2011 г. вирус данной генетической линии был официально зарегистрирован в Таджикистане [12]. В 2013 г. ящур типа Азия-1, относящийся к новой генетической линии BD-18 (G-IX), был зафиксирован в Бангладеш [8].

По данным МЭБ за 2017 г., очаги ящура типа Азия-1 генетической линии G-VIII, которую впервые выявили в Королевстве Бахрейн в 2009 г., были зарегистрированы в Непале, Афганистане и Мьянме.

В 2018 г. вирус ящура типа Азия-1 был выявлен в следующих странах: Непал, Афганистан, Иран и Бангладеш. Было установлено, что обнаруженный в Иране и Афганистане ящур относится к генетической линии Sindh-08.

В 2019 г. о регистрации вируса ящура типа Азия-1 на своей территории сообщили Афганистан, Бангладеш, Иран и Пакистан (рис. 1).

Как видно на представленной диаграмме (рис. 2), наиболее частые сообщения о вспышках ящура

типа Азия-1 приходили из Афганистана (в 2001–2005, 2009–2011, 2017–2019 гг.) и Пакистана (в 2001–2005, 2009–2011, 2019 гг.). В Китае ящур данного типа регистрировали на протяжении 2001–2009 гг. Возможными причинами циркуляции ящура типа Азия-1 в этих странах являются неконтролируемая миграция диких парнокопытных животных, а также нелегальные импорт и экспорт продуктов животного и растительного происхождения [13].

Российская Федерация являлась благополучной по ящуру типа Азия-1 страной до 2005 г., когда было выявлено 15 очагов ящура в Амурской области, Хабаровском и Приморском краях (рис. 3). Несмотря на то что эти территории входили в зону профилактической иммунизации восприимчивого поголовья против ящура, вакцинация против типа Азия-1 не проводилась. Первый очаг был установлен 9 июня 2005 г. в селе Буссе Свободненского района Амурской области, на левом берегу Амура, который отделяет населенный пункт от территории Китая. Во второй половине августа 2005 г. новые очаги ящура типа Азия-1 были зарегистрированы в Хабаровском и Приморском краях. Примерно в это же время поступило сообщение о возникновении ящура на востоке Монголии в аймаке Дорнод, граничащем с Китаем.

В Хабаровском крае ящур был выявлен среди крупного рогатого скота в Бикинском и Вяземском районах в 4 населенных пунктах, расположенных вблизи границы с Китаем. 21 августа 2005 г. ящур был подтвержден у коров, принадлежавших КГУСП «Лермонтовское»

Бикинского района. Зона выпаса скота пролегла вблизи села Добролюбово, в пойме реки Уссури, которая является пограничной с Китаем. 23 августа 2005 г. ящур зафиксирован среди крупного рогатого скота на летней площадке КГУСП «Лончаковское» Бикинского района. В Вяземском районе ящур был диагностирован у крупного рогатого скота в селе Видном. Еще один очаг ящура в том же районе был установлен 24 августа в отделении Шереметьево КГУСП «Котиково», где находилось 56 голов крупного рогатого скота.

Широкое распространение ящура типа Азия-1 получил в Приморском крае. Первое подозрение на заболевание крупного рогатого скота ящуром возникло 26 августа 2005 г. в частном секторе в селе Красный Кут Спасского района, расположенного на границе с Китаем. С 27 августа по 2 сентября заболевание животных ящуром было выявлено еще в 7 населенных пунктах 6 районов Приморского края, 4 из которых граничат с Китаем. Так, в селе Павло-Федоровка Кировского района и в селе Абрамовка Михайловского района ящур был диагностирован 27 августа у крупного рогатого скота, 28 августа заболевание скота ящуром отмечено в селе Игнатьевка Пожарского района, 31 августа – в селе Сиваковка Хорольского района, на ферме ООО «Приморский рис», 2 сентября в частных подворьях в селе Лучки того же района клинические признаки ящура были отмечены у коров и свиньи. Заболевание было установлено среди коров в частном секторе села Первомайском Ханкайского района 30 августа и 2 сентября – в поселке Славянка Хасанского



Рис. 1. Эпизоотическая ситуация в мире по ящуру в 2017–2019 гг. (данная карта подготовлена сотрудниками Информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

Fig. 1. Global FMD epidemic situation in 2017–2019 (the map has been prepared by the officials of the Information Analysis Centre, FGBU "ARRIAH")

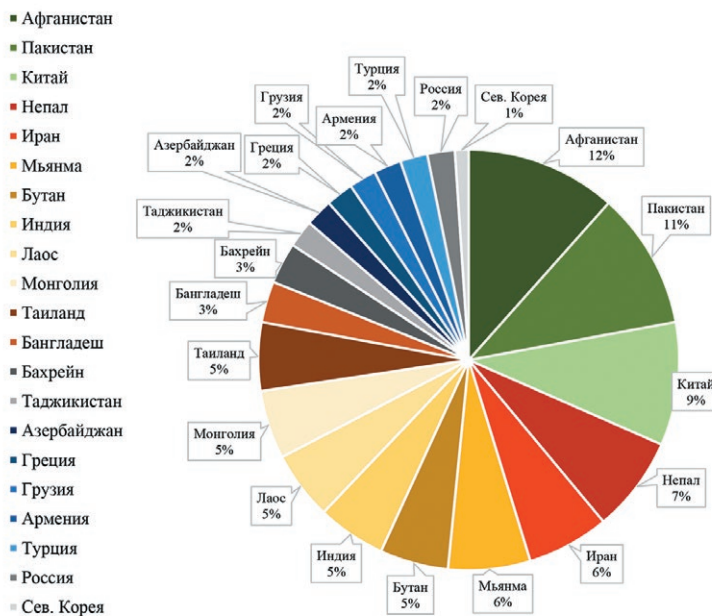


Рис. 2. Частота регистрации ящура типа Азия-1 в различных странах

Fig. 2. Frequency of Asia-1 FMD reports in different countries

района. Последние очаги ящура в Приморском крае были зафиксированы 7 сентября 2005 г. в Лесозаводском районе, в селе Невском, граничащем с Китаем [14].

Вспышки ящура типа Азия-1 продолжились и в 2006 г. Ящур был зарегистрирован среди крупного рогатого скота в населенных пунктах, расположенных вблизи российско-китайской границы: 23 января в селе Средняя Борзя Калганского района Читинской области и 22 февраля в селе Куропатино Тамбовского района Амурской области [15].

Филогенетический анализ показал, что все российские изоляты генетически очень близки вирусу, вызвавшему в 2005–2006 гг. масштабную эпизоотию ящура типа Азия-1 в Китае [16].

В России создана противоящурная буферная зона, охватывающая всю южную границу страны [1, 17]. После вспышек ящура, вызванных вирусом типа Азия-1, профилактическую иммунизацию в буферной зоне стали проводить с использованием трехвалентной вакцины против ящура типов А, О и Азия-1. До 2015 г. систематическая профилактическая вакцинация восприимчивых к ящуру животных осуществлялась также и на территории Московской и Владимирской областей в связи с расположением там биологических предприятий, производящих противоящурную вакцину. Сейчас эти регионы не входят в буферную зону, так как предприятия соблюдают соответствующие требования безопасности, которые не допускают выноса возбудителя (рис. 4).

18 октября 2016 г. вспышка заболевания ящуром типа Азия-1 была зафиксирована среди крупного рогатого скота одного из хозяйств в деревне Вышманово Собинского района Владимирской области. Вспышку



Рис. 3. Распространение ящура типа Азия-1 на территории Российской Федерации в 2005–2006 гг. (данная карта подготовлена сотрудниками Информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

Fig. 3. Asia-1 FMD spread in the Russian Federation in 2005–2006 (the map has been prepared by the officials of the Information Analysis Centre, FGBI "ARRIAH")



Рис. 4. Зона профилактической иммунизации против ящура (А, О, Азия-1) на территории Российской Федерации (данная карта подготовлена сотрудниками Информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

Fig. 4. Zone of preventive vaccination against FMD (A, O, Asia-1) in the Russian Federation (the map has been prepared by the officials of the Information Analysis Centre, FGBU "ARRIAH")

ликвидировали в первичном очаге путем отчуждения и уничтожения всех восприимчивых животных в неблагополучном пункте. При проведении эпизоотологического расследования достоверно определить источник возбудителя инфекции не удалось [18].

Актуальной на сегодняшний день задачей является сохранение благополучия Российской Федерации по ящуру, которое достигается благодаря реализации таких мер, как мониторинг эпизоотической ситуации в мире по заболеванию, профилактическая вакцинация восприимчивого поголовья в буферной зоне с использованием актуальных производственных штаммов и проведение диагностических исследований с целью обнаружения вируса ящура [17, 19, 20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая полученные в ходе анализа данные, можно сделать вывод о том, что реальная картина распространения вируса ящура типа Азия-1 в мире отличается от официальной. Особенно это касается стран Азии и Ближнего Востока, где по ряду причин не ведется строгая отчетность по заболеванию ящуром животных, несмотря на постоянную циркуляцию вируса в регионах. Неконтролируемая миграция диких парнокопытных (сайгаки, дзерены, буйволы) и недостаточный уровень финансирования ветеринарных служб стран приводит к тому, что вирус во многих очагах остается нетипированным, а это чрезвычайно искажает реальную ситуацию о распространении ящура в мире.

Ящур типа Азия-1 нанес значительный ущерб животноводству и экономике России в 2005–2006 гг., когда вероятный занос вируса из Китая привел к возникновению множественных очагов инфекции в стране и огромным затратам на их ликвидацию.

Для того чтобы минимизировать риск заноса вируса ящура на территорию нашего государства, следует уделить особое внимание мониторингу эпизоотической ситуации в странах Азии и усилить меры контроля качества ввозимой в Российскую Федерацию продукции. Большое значение имеет укрепление международного сотрудничества со странами Азиатско-Тихоокеанского региона с целью принятия совместных мер по противодействию ящуру.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 2, 4–9, 13 см. REFERENCES)

1. Лозовой Д. А., Рахманов А. М. Комплекс совместных мер стран СНГ по профилактике и борьбе с ящуром и его реализация с учетом глобальной эпизоотической ситуации. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. 2018; 16: 23–36. eLIBRARY ID: 37476553.
3. Рахманов А. М., Кременчукская С. Р., Мищенко А. В., Щербанов А. В. Результаты мониторинговых исследований по ящуру в России в 2011 году. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. 2012; 10: 7–18. eLIBRARY ID: 18881508.
10. Гуленкин В. М. Оценка риска заноса ящура на территорию Российской Федерации. *Ветеринарная патология*. 2006; 4 (19): 18–27. eLIBRARY ID: 16823136.
11. Борисов В. В., Рахманов А. М., Белик Е. В., Кременчукская С. Р., Камалова Н. Е., Мищенко А. В. и др. Результаты мониторинговых исследований по ящуру в России в 2008 году. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. 2009; 7: 3–14. eLIBRARY ID: 14933121.

12. Кременчугская С. Р., Майорова Т. К., Камалова Н. Е., Афонина Д. Н. Результаты изучения антигенного соответствия изолятов вируса ящура типа Азия-1 производственному штамму Азия-1/Шамир 3/89. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. 2012; 10: 19–25. eLIBRARY ID: 18881509.

14. Груздев К. Н., Байбаков Т. З., Герасимов В. Н., Диев В. И., Захаров В. М., Камалова Н. Е. и др. Эпизоотическая ситуация по ящуру типа Азия-1 в России в 2005 году и анализ эффективности мер борьбы. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. 2006; 4: 3–11. eLIBRARY ID: 14453995.

15. Мищенко А. В., Мищенко В. А., Дудников С. А., Захаров В. М., Яременко Н. А. Опыт ликвидации ящура в первичных очагах. *Ветеринария*. 2011; 11: 7–12. eLIBRARY ID: 17015951.

16. Щербаков А. В. Молекулярная эпизоотология ящура в России (филогенетический анализ российских изолятов вируса ящура). *Ветеринария сегодня*. 2015; 3 (14): 30–36. eLIBRARY ID: 24343426. Режим доступа: <https://veterinary.arriah.ru/jour/article/view/204>.

17. Михалишин Д. В., Мищенко А. В., Захаров В. М. Эффективность буферной зоны по ящуру в Закавказье. *Ветеринария*. 2013; 10: 16–19. eLIBRARY ID: 20502275.

18. Семакина В. П., Акимова Т. П., Мищенко В. А., Караулов А. К. Анализ эпизоотической ситуации по ящуру в России с 2010 г. по март 2019 г. *Ветеринария*. 2019; 11: 16–19. DOI: 10.30896/0042-4846.2019.22.11.16-20.

19. Рахманов А. М., Мищенко А. В., Фомина С. Н. Эпизоотическая ситуация по ящуру животных на Северном Кавказе. *Вестник ветеринарии*. 2014; 2 (69): 11–14. eLIBRARY ID: 21604671.

20. Семакина В. П., Мищенко В. А. Угроза ящура для российского животноводства. В кн.: *Достижения молодых ученых в ветеринарную практику: материалы IV Международной научной конференции, посвященной 55-летию аспирантуры ФГБУ «ВНИИЗЖ»*. Владимир; 2016; 67–73. eLIBRARY ID: 29439554.

REFERENCES

1. Lozovoy D. A., Rakhmanov A. M. Complex of joint CIS measures for FMD prevention and control and its implementation in the context of global epidemic situation. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2018; 16: 23–36. eLIBRARY ID: 37476553. (in Russian)
2. Jamal S. M., Belsham G. J. Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Vet. Res.* 2013; 44 (1): 116. DOI: 10.1186/1297-9716-44-116.
3. Rakhmanov A. M., Kremenchugskaya S. R., Mischenko A. V., Scherbakov A. V. Results of FMD surveillance in Russia in 2011. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2012; 10: 7–18. eLIBRARY ID: 18881508. (in Russian)
4. OIE. HANDISTATUS II. Available at: <http://web.oie.int/h2/report.asp?lang=en> (date of access: 14.09.2019).
5. World Reference Laboratory for Foot-and-Mouth Disease (WRLFMD). Available at: <https://www.wrlfmd.org> (date of access: 14.09.2019).
6. World Organisation for Animal Health. Available at: <http://www.oie.int/> (date of access: 16.09.2019).
7. Subramaniam S., Mohapatra J. K., Das B., Sharma G. K., Biswal J. K., Mahajan S., et al. Capsid coding region diversity of re-emerging lineage C foot-and-mouth disease virus serotype Asia1 from India. *Arch. Virol.* 2015; 160 (7): 1751–1759. DOI: 10.1007/s00705-015-2459-2.
8. Ali M. R., Alam A. S. M. R. U., Amin M. A., Siddique M. A., Sultana M., Hossain M. A. Emergence of novel lineage of foot-and-mouth disease

virus serotype Asia1 BD-18 (G-IX) in Bangladesh. *Transbound. Emerg. Dis.* 2020; 67 (2): 486–493. DOI: 10.1111/tbed.13381.

9. Ansell D. M., Samuel A. R., Carpenter W. C., Knowles N. J. Genetic relationships between foot-and-mouth disease type Asia 1 viruses. *Epidemiol. Infect.* 1994; 112 (1): 213–224. DOI: 10.1017/s0950268800057587.

10. Gulenkin V. M. Risk assessment of FMD virus introduction to the territory of the Russian Federation. *Veterinarnaya patologiya*. 2006; 4 (19): 18–27. eLIBRARY ID: 16823136. (in Russian)

11. Borisov V. V., Rakhmanov A. M., Belik Ye. V., Kremenchugskaya S. R., Kamalova N. Ye., Kanchina A. V., et al. Results of FMD monitoring in Russia in 2008. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2009; 7: 3–14. eLIBRARY ID: 14933121. (in Russian)

12. Kremenchugskaya S. R., Mayorova T. K., Kamalova N. Ye., Afonina D. N. Results of analysis of antigenic match between Asia-1 FMD virus isolates and Asia-1/Shamir 3/89 production strain. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2012; 10: 19–25. eLIBRARY ID: 18881509. (in Russian)

13. Di Nardo A., Knowles N. J., Paton D. J. Combining livestock trade patterns with phylogenetics to help understand the spread of foot and mouth disease in sub-Saharan Africa, the Middle East and Southeast Asia. *Rev. Sci. Tech. OIE*. 2011; 30 (1): 63–85. DOI: 10.20506/rst.30.1.2022.

14. Gruzdev K. N., Baibikov T. Z., Gerasimov V. N., Diev V. L., Zakharov V. M., Kamalova N. Ye., et al. Foot and mouth disease type Asia-1 epidemic situation in Russia in 2005 and analysis of efficacy of control measures. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2006; 4: 3–11. eLIBRARY ID: 14453995. (in Russian)

15. Mischenko A. V., Mischenko V. A., Dudnikov S. A., Zakharov V. M., Yaryomenko N. A. Experience of foot-and-mouth disease eradication in primary foci of infection. *Veterinariya*. 2011; 11: 7–12. eLIBRARY ID: 17015951. (in Russian)

16. Scherbakov A. V. FMD molecular epizootology in Russia (phylogenetic analysis of Russian FMDV isolates). *Veterinary Science Today*. 2015; 3 (14): 30–36. eLIBRARY ID: 24343426. Available at: <https://veterinary.arriah.ru/jour/article/view/204>. (in Russian)

17. Mikhailishin D. V., Mischenko A. V., Zakharov V. M. Efficiency of Transcaucasian FMD buffer zone. *Veterinariya*. 2013; 10: 16–19. eLIBRARY ID: 20502275. (in Russian)

18. Semakina V. P., Akimova T. P., Mischenko V. A., Karaulov A. K. An analysis of the FMD epidemic situation in Russia between 2010 and March 2019. *Veterinariya*. 2019; 11: 16–19. DOI: 10.30896/0042-4846.2019.22.11.16-20. (in Russian)

19. Rakhmanov A. M., Mischenko A. V., Fomina S. N. Foot and mouth disease epizootic situation in North Caucasus. *Vestnik veterinarii*. 2014; 2 (69): 11–14. eLIBRARY ID: 21604671. (in Russian)

20. Semakina V. P., Mischenko V. A. FMD threat for Russian livestock production. In: *Achievements of early career researchers to veterinary practice [Dostizheniya molodykh uchenykh v veterinarnuyu praktiku]: proceedings of the IVth International Research Conference devoted to the 55th anniversary of the Unit for postgraduate education of the FGBI "ARRIAH"*. Vladimir; 2016; 67–73. eLIBRARY ID: 29439554. (in Russian)

Поступила 28.07.2020

Принята в печать 14.10.2020

Received on 28.07.2020

Approved for publication on 14.10.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Куников Сергей Александрович, сотрудник референтной лаборатории диагностики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Фомина Светлана Николаевна, кандидат ветеринарных наук, заведующий референтной лабораторией диагностики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Sergey A. Kunikov, Researcher, Reference Laboratory for FMD Diagnosis, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Svetlana N. Fomina, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Reference Laboratory for FMD Diagnosis, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Показатели качества молока высокопродуктивных коров на фоне применения противомаститной вакцины

М. Н. Исакова¹, У. В. Сивкова², М. В. Ряпосова³, И. А. Шкуратова⁴, А. В. Лысов⁵

ФГБНУ «Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр

Уральского отделения Российской академии наук» (ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН), г. Екатеринбург, Россия

¹ ORCID 0000-0001-7130-5627, e-mail: tmarya105@yandex.ru

² ORCID 0000-0003-0501-3727, e-mail: sivkova@uralbiovet.ru

³ ORCID 0000-0002-5699-3924, e-mail: riaposova76@mail.ru

⁴ ORCID 0000-0003-0025-3545, e-mail: info@urnivi.ru

⁵ ORCID 0000-0003-2480-2019, e-mail: vldc_urnivi@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Одним из качественных показателей сырого молока является содержание в нем соматических клеток, играющих защитную роль против инфекционных заболеваний молочной железы коров. В статье приведен анализ уровня соматических клеток и бактериальной обсемененности молока на фоне применения противомаститной вакцины Startvac. Исследования проводились в сравнении: на базе комплекса и фермы, различающихся условиями содержания и технологией доения. Через 6 месяцев с начала применения вакцины уровень соматических клеток в комплексе снизился на 60 тыс./мл, на ферме — на 182 тыс./мл. Структура возбудителей была представлена такими бактериями, как *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*. В секрете вымени также были выделены *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Lactobacillus*. После года иммунизации животных количество соматических клеток в комплексе и на ферме снизилось на 245 и 216 тыс./мл соответственно, при этом выделенная из секрета молочной железы микрофлора в 43,75% случаев была представлена *Streptococcus* spp. Спустя два года с начала применения вакцины показатель соматических клеток в сборном молоке в комплексе и на ферме составил 371 и 725 тыс./мл соответственно. Исследование секрета молочной железы показало наличие в 27,27% случаев *Streptococcus* spp.; *Staphylococcus aureus* и *Enterococcus faecium* выделены в 18,18% исследуемых проб. Установлено, что спустя три года иммунизации основной причиной мастита у коров было наличие *Streptococcus* spp. (55,00%). За четырехлетний период исследований выявлена тенденция к снижению показателя соматических клеток в сборном молоке высокопродуктивных коров, а также спектра возбудителей, вызывающих воспаление в молочной железе. Количество соматических клеток в сборном молоке на фоне иммунизации животных снизилось в условиях фермы и комплекса на 286 и 432 тыс./мл соответственно. За период исследования наблюдается снижение высеваемости *Staphylococcus aureus* на 19,41%.

Ключевые слова: мастит, противомаститная вакцина Startvac, соматические клетки, возбудители мастита, качество молока.

Благодарность: Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг. по направлению «Молекулярно-биологические и нанобиотехнологические методы создания биопрепаратов нового поколения, технологии и способы их применения с целью борьбы с особо опасными инфекционными, паразитарными и незаразными болезнями животных».

Для цитирования: Исакова М. Н., Сивкова У. В., Ряпосова М. В., Шкуратова И. А., Лысов А. В. Показатели качества молока высокопродуктивных коров на фоне применения противомаститной вакцины. *Ветеринария сегодня*. 2020; 4 (35): 255–260. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-255-260.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Исакова Мария Николаевна, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник лаборатории патологии органов размножения и болезней молодняка ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, 620142, Россия, г. Екатеринбург, ул. Белинского, 112 а, e-mail: tmarya105@yandex.ru.

UDC 619:618.19-002:636.2:615.371:637.12.05

Quality profile of milk from high producing dairy cows vaccinated against mastitis

M. N. Isakova¹, U. V. Sivkova², M. V. Ryaposova³, I. A. Shkuratova⁴, A. V. Lysov⁵

Federal State Budgetary Scientific Institution "Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre,

Ural Branch of the Russian Academy of Sciences" (FSBSI UrFASRC UrB of RAS), Ekaterinburg, Russia

¹ ORCID 0000-0001-7130-5627, e-mail: tmarya105@yandex.ru

² ORCID 0000-0003-0501-3727, e-mail: sivkova@uralbiovet.ru

³ ORCID 0000-0002-5699-3924, e-mail: riaposova76@mail.ru

⁴ ORCID 0000-0003-0025-3545, e-mail: info@urnivi.ru

⁵ ORCID 0000-0003-2480-2019, e-mail: vldc_urnivi@mail.ru

SUMMARY

One of the raw milk quality criteria is the count of somatic cells, produced by the cow's immune system to fight infectious diseases of the mammary gland. The paper presents the analysis of somatic cell count and total bacteria count of milk from cows, vaccinated against mastitis using Startvac vaccine. Tests were performed as a comparison between a dairy unit and a farm under different management conditions and using different milking techniques. Six months after the start of the vaccine application the somatic cell count at the dairy unit decreased by 60 thousand/ml, at the farm by 182 thousand/ml. The agent profile was represented by the following bacteria: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*. *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Lactobacillus* were also isolated from udder secretion. After a year of immunization somatic cell count both at the unit and on the farm decreased by 245 and 216 thousand/ml respectively; it is noteworthy that 43.75% of microflora isolated from mammary gland secretion was represented by *Streptococcus* spp. After two years of the vaccine use the somatic cell count was equal to 371 and 725 thousand/ml at the unit and on the farm respectively. Tests of mammary gland secretions revealed *Streptococcus* spp. in 27.27% of cases, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* were isolated in 18.18% of tested samples. It was established that after three years of the vaccine use the major cause of mastitis in cows was *Streptococcus* spp. (55.00%). During four years of tests, a downward trend in somatic cell count of bulk milk from high producing dairy cows as well as in the number of agents responsible for inflammation in a mammary gland was detected. Somatic cell count of milk from vaccinated animals decreased by 286 and 432 thousand/ml at the unit and on the farm respectively. During the test period *Staphylococcus aureus* isolation rate declined by 19.41%.

Key words: mastitis, Startvac mastitis vaccine, somatic cells, mastitis agents, milk quality.

Acknowledgements: The studies were performed with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation within the framework of the Program of Fundamental Research at the State Scientific Academies for 2013–2020 using Molecular, Biological and Nanobiotechnological Techniques for the Development of Next Generation Biologicals, Technologies and Methods of Their Use to Control Highly Dangerous Infectious, Parasitic and Non-Contagious Animal Diseases.

For citation: Isakova M. N., Sivkova U. V., Ryaposova M. V., Shkuratova I. A., Lysov A. V. Quality profile of milk from high producing dairy cows vaccinated against mastitis. *Veterinary Science Today*. 2020; 4 (35): 255–260. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-255-260.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Mariya N. Isakova, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Pathology of Reproductive Organs and Diseases of Young Animals, FSBI UrFASRC UrB of RAS, 620142, Russia, Ekaterinburg, Belinskogo str., 112 a, e-mail: tmarya105@yandex.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших условий увеличения производства молока и повышения эффективности молочного скотоводства в стране является совершенствование существующих пород, повышение их генетического потенциала [1]. При этом большое значение при производстве молока отводится его качеству.

Качественным показателем сырого молока является содержание в нем соматических клеток, которые играют защитную роль против инфекционных заболеваний молочной железы и представляют собой клетки различных тканей и органов. К ним относятся лейкоциты, эритроциты, клетки цилиндрического, плоского и кубического эпителия молочной железы [2–5]. Многие генетические факторы и факторы окружающей среды влияют на количество и виды лейкоцитов, которые составляют большинство соматических клеток, присутствующих в молоке здоровых животных. На качество молока при его производстве негативно влияет наличие воспаления молочной железы высокопродуктивных коров, которое возникает в результате инфицирования и проявляется повышением уровня соматических клеток. Подавляющее большинство соматических клеток молочной железы, инфицированной возбудителями мастита, составляют нейтрофилы [6, 7]. Низкое количество соматических клеток является надежным показателем высококачественного молока, свободного от патогенных микроорганизмов.

Лечение с применением антибактериальных средств, несмотря на наличие чувствительных патогенов, часто дает неудовлетворительные с точки зрения терапии результаты, при этом компоненты препаратов в течение длительного времени выделяются с молоком. Поиск различных подходов, позволяющих осуществлять производство молока с низким содержанием соматических клеток и удерживать его на оптимальном уровне, является актуальной задачей в ветеринарной практике. Одной из мер профилактики мастита, в частности поддержание соматических клеток на низком уровне, является вакцинация коров [2, 8].

Цель исследования заключалась в оценке влияния противомаститной вакцины Startvac (Laboratorios Hipra, Испания) на уровень соматических клеток и бактериальную обсемененность молока высокопродуктивных коров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась на протяжении 2016–2020 гг. в лаборатории патологии органов размножения и болезней молодняка и отделе ветеринарно-лабораторной диагностики с испытательной лабораторией ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН.

Экспериментальные исследования выполнены на базе племенного завода, расположенного в Сысертском районе Свердловской области. В сельскохозяйственной организации содержится 1400 коров

черно-пестрой породы со среднегодовой молочной продуктивностью 9299 кг. Средняя продолжительность хозяйственного использования коров составляет 3,8 лактации. Исследования проводились в сравнении: на базе комплекса (с беспривязной системой содержания и технологией доения в специальном доильном зале с использованием установки «Параллель») и на базе фермы (с привязной системой содержания и технологией доения на стационарных линейных доильных установках).

Вакцина против мастита коров Startvac (Laboratorios Hipra, Испания) зарегистрирована в Российской Федерации в 2010 г. По внешнему виду представляет собой однородную эмульсию желтовато-белого цвета. Расфасована по 1, 5 и 25 доз в стеклянные флаконы, герметично укупоренные резиновыми пробками, укрепленными алюминиевыми колпачками. Вакцина изготовлена из инактивированных культур *Escherichia coli* (J5) и *Staphylococcus aureus* (CP8), клетки которого содержат слизистый антигенный комплекс (SAAC), с добавлением вспомогательных компонентов: жидкого парафина 9,5 мг/мл и бензилового спирта 10,5 мг/мл. В одной прививной дозе (2 мл) содержится не менее 50 эффективных иммуногенных доз *Escherichia coli* штамма J5 и не менее 50 эффективных иммуногенных доз *Staphylococcus aureus* (CP8) штамма SP 140. Вакцину вводят внутримышечно в объеме 2 мл, температура ее должна быть от +15 до +25 °C. Перед применением раствор встряхивают.

Первая иммунизация вакциной Startvac всех коров стада на базе исследуемого племенного завода была проведена в декабре 2016 г., через 3 недели животных ревакцинировали и затем повторяли вакцинацию каждые 3 месяца. К моменту написания статьи было осуществлено 14 вакцинаций, последняя из которых – в апреле 2020 г.

Исследование сборного сырого молока на показатель соматических клеток проводилось ежемесячно с использованием анализатора соматических клеток в молоке DCC (GMU Tumba DeLaval International AB, Швеция).

В период исследования также были отобраны пробы секрета молочной железы коров для дальнейшего молекулярно-генетического и микробиологического исследования с целью определения влияния вакцинации животных на наличие возбудителей, вызывающих воспалительные процессы в молочной железе. Исследование отобранного материала проведено на приборе Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Австралия) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием комплекта реагентов тест-систем «Ветскрин. СТРЕПТОПОЛ-В», «Ветскрин. СТАФИПОЛ», «Ветскрин. КОЛИПОЛ», «Ветскрин. СТРЕПТОПОЛ» (ООО «ИДС», Москва). При проведении бактериологического и микологического исследования из проб секрета вымени коров делали посевы на жидкие и плотные питательные среды: мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар, среду Эндо, среду Сабуро, маннит-солевой агар, энтерококкагар, цветные среды Гисса. Выделенные изоляты идентифицировали, руководствуясь определителем бактерий Берджи и определителем патогенных и условно-патогенных грибов. За время изучения эффективности использования противомаститной вакцины исследовано 125 проб секрета вымени высокопродуктивных коров.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам ранее проведенных исследований на племенном заводе наблюдалось неоднократное поражение коров маститом в течение года. Заболеваемость в 2015 г. составила 12,2% от общего количества исследованных животных дойного стада, в 2016 г. наблюдалось увеличение воспалительных заболеваний молочной железы у коров до 22,1%, что в 1,8 раза больше по сравнению с предыдущим годом. В 2015 г. клиническая форма мастита была диагностирована в 6,8% случаев, субклинический мастит был выявлен у 5,4% исследуемых коров. В 2016 г. произошло изменение в соотношении форм мастита: наибольшее количество животных имели субклиническое поражение молочной железы (17,4%), доля клинического мастита составила 4,8% [9]. До вакцинации уровень соматических клеток в сборном молоке высокопродуктивных коров, содержащихся в животноводческом комплексе, находился на уровне 695 тыс./мл, а на ферме данный показатель составил 916 тыс./мл. Основными микроорганизмами по частоте обнаружения в образцах секрета вымени коров являлись *Staphylococcus aureus* (29,42%) и *Streptococcus* spp. (23,53%). Бактерии рода *Enterococcus* высевались в 11,76% проб. В составе исследуемых образцов в 17,65% проб регистрировали плесневые грибы рода *Aspergillus*. Также были выделены грамотрицательные бактерии рода *Klebsiella* spp. (5,88%), *Pseudomonas* (5,88%), *Enterobacter* (5,88%). При этом микрофлора высевалась как в монокультуре (27,3%), так и в ассоциации культур бактерий (55,6%), грибов и дрожжей (17,1%). Данные исследования показали, что мастит у животных и, как следствие, повышенное содержание соматических клеток в молоке вызывались достаточно широким спектром возбудителей.

В связи с высоким уровнем заболеваемости лактирующих животных субклиническим маститом, вызывающим повышенное содержание соматических клеток в молоке, и наличием большого количества животных с воспалительным процессом в вымени, вызванным золотистым стафилококком, было принято решение о применении противомаститной вакцины Startvac.

На момент иммунизации животных на базе комплекса с использованием технологии доения в специальном доильном зале в пробах секрета молочной железы коров уровень соматических клеток составил 559 тыс./мл. На ферме, где доение осуществляется с использованием стационарных линейных установок, уровень соматических клеток в сборном молоке находился на уровне 822 тыс./мл.

После начала вакцинации уровень соматических клеток в сборном молоке постепенно снижался, затем происходило незначительное повышение, но тенденция к спаду сохранялась. Через шесть месяцев после начала иммунизации коров уровень соматических клеток в животноводческом комплексе и на ферме снизился на 60 и 182 тыс./мл соответственно. Спустя полгода в большинстве случаев мастит у коров был вызван *Enterococcus faecium* (20,00%), *Staphylococcus aureus* (17,33%), *Streptococcus* spp. (17,33%), *Pseudomonas aeruginosa* (14,67%), *Streptococcus agalactiae* (8,02%). В секрете вымени также были выделены *Staphylococcus saprophyticus* (5,33%), *Staphylococcus epidermidis* (5,33%), *Enterococcus faecalis* (5,33%), *Escherichia coli* (1,33%), *Bacillus* (1,33%), *Lactobacillus* (1,33%). В 2,67% исследуемых проб секрета молочной железы

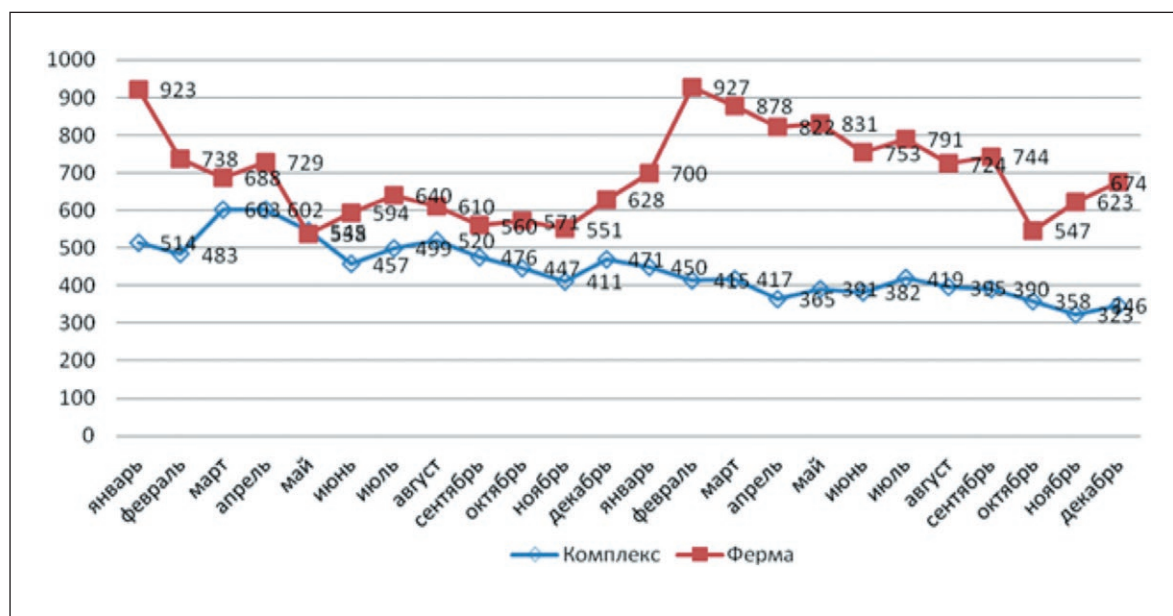


Рис. 1. Динамика уровня соматических клеток в период с 2017 по 2018 г.

Fig. 1. Dynamics in somatic cell counts in 2017–2018

рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов не наблюдался.

При анализе проб сборного молока коров после года применения противомаститной вакцины на базе комплекса с использованием беспривязной системы содержания и технологией доения в специальном доильном зале с доильной установкой «Параллель» наблюдалась тенденция стойкого снижения уровня соматических клеток, который составил 450 тыс./мл, что на 245 тыс./мл меньше значения до начала иммунизации животных. На ферме с использованием привязной системы содержания и технологией доения на стационарных линейных доильных установках стойкой тенденции снижения уровня соматических клеток в молоке высокопродуктивных коров не наблюдалось. Так, через год после начала применения вакцины Startvac уровень соматических клеток снизился на 216 тыс./мл, однако в следующем месяце наблюдалось повышение данного показателя на 227 тыс./мл по сравнению с предыдущим месяцем (рис. 1). Выделенная микрофлора из секрета молочной железы в 43,75% случаев была представлена *Streptococcus* spp., в 31,25% исследуемых проб высевался *Streptococcus agalactiae*. На долю мастита, вызванного *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, приходилось по 12,50% исследуемых проб.

После двух лет вакцинации животных против мастита показатель соматических клеток в сборном молоке в комплексе и на ферме составил 371 и 725 тыс./мл соответственно (рис. 2). Таким образом, в комплексе наблюдается постепенное снижение данного показателя, а на ферме – скачкообразное. Основная доля в спектре возбудителей мастита приходилась на *Streptococcus* spp. (27,27%). Количество *Staphylococcus aureus* (18,18%) и *Enterococcus faecium* (18,18%) в исследуемых пробах находилось на одинаковом уровне. Доля *Escherichia coli* среди выявленных при исследовании секрета молочной железы патогенов составила 9,10%. Количество проб с отсутствием роста микроорганизмов соответствовало 27,27%.

По истечении трех лет иммунизации высокопродуктивных коров показатель соматических клеток в сборном молоке находился на уровне 630 тыс./мл на ферме и 263 тыс./мл в комплексе, что на 286 и 432 тыс./мл ниже данного показателя до применения программы вакцинации. Результаты молекулярно-генетических и микробиологических исследований показали, что большинство случаев заболевания коров маститом вызвано *Streptococcus* spp. (55,00%). *Staphylococcus aureus* высевали в 10,00% исследуемых проб, *Escherichia coli* и *Streptococcus agalactiae* диагностированы в одинаковом количестве случаев (5,00%). В 25,00% исследуемых проб отсутствовал рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

Полученные в период вакцинации высокопродуктивных коров противомаститной вакциной Startvac результаты молекулярно-генетических и микробиологических исследований показали значительное снижение спектра возбудителей, вызывающих воспаление в молочной железе. Произошло снижение высеваемости *Staphylococcus aureus* на 19,41%, которое объясняется повышением концентрации антител у привитых животных. Лейкоциты, содержащиеся в молоке, выполняют одну из основных защитных функций против возбудителей мастита. Для нормального функционирования защитных свойств иммунитета антитела должны активизировать выработку лейкоцитов и быть направлены против определенных бактериальных агентов. Проведенными ранее исследованиями по изучению иммунобиологического статуса коров установлено, что воспалительные реакции, протекающие в молочной железе, сопровождаются изменениями общей резистентности организма животных, в том числе иммунологических показателей крови. При изучении ответной реакции организма на введение вакцины, которую оценивали по показателям общей резистентности, было отмечено увеличение количества Т-лимфоцитов на 12,1%, В-лимфоцитов на 7,0%. Методом опсонофагоцитарной реакции было

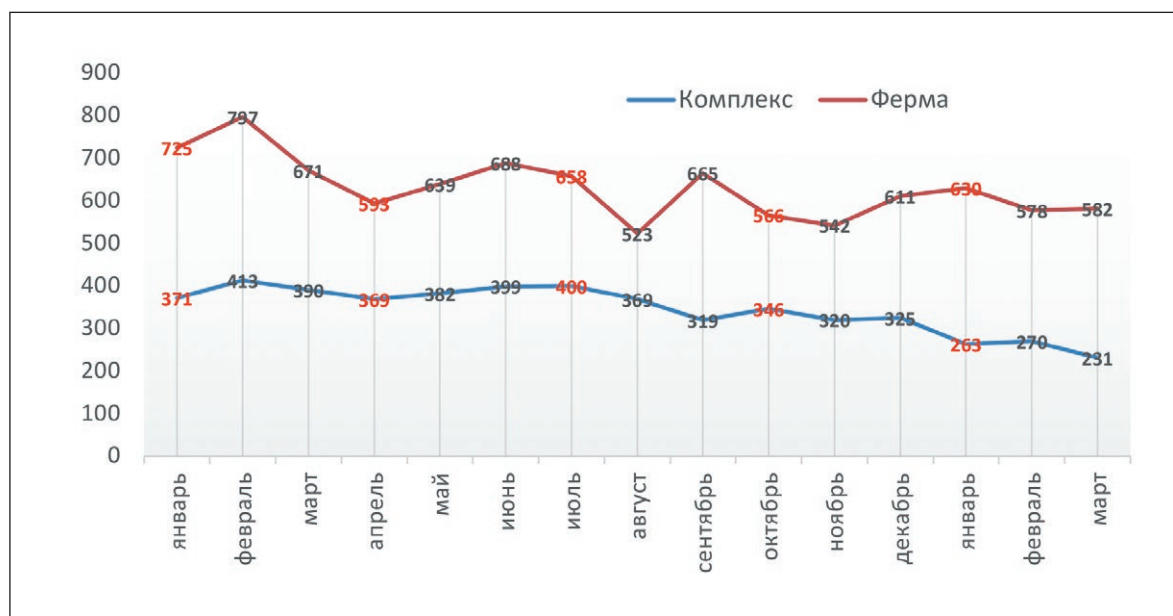


Рис. 2. Динамика уровня соматических клеток в период с 2019 по 2020 г.

Fig. 2. Dynamics in somatic cells counts in 2019–2020

установлено увеличение фагоцитарной активности нейтрофилов на 14,3%. У животных наблюдалось стойкое снижение уровня циркулирующих иммунных комплексов в крови до $(106,8 \pm 3,4)$ у. е., что объясняется снижением воспалительной реакции в молочной железе за счет активации факторов гуморального иммунитета [10].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На фоне применения противомаститной вакцины Startvac и использования основных схем лечения мастита у высокопродуктивных коров, используемых племенным заводом, наблюдается положительная тенденция снижения уровня соматических клеток в сборном молоке. Количество соматических клеток на фоне иммунизации животных в комплексе с беспривязной системой содержания и технологией доения в специальном доильном зале с использованием установки «Параллель» сократилось на 432 тыс./мл, в то время как на ферме у высокопродуктивных коров с привязной системой содержания и технологией доения на стационарных линейных доильных установках уровень соматических клеток снизился только на 286 тыс./мл. Разница в количестве соматических клеток в сборном молоке высокопродуктивных коров, содержащихся в условиях комплекса и в условиях фермы, может быть объяснена различиями в содержании и технологии машинного доения, что, в свою очередь, может влиять на образование и количество патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, вызывающих мастит. Данное предположение будет служить целью последующих исследований в данном направлении. Вакцинация животных способствовала снижению бактериальной обсемененности молока, обусловленной *Staphylococcus aureus*, на 19,41%. Таким образом, полученные результаты показали перспективность дальнейшего использования вакцины и внедрения ее в программу по борьбе и контролю маститов и улучшению качества молока.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 6, 7 см. REFERENCES)

1. Шкуратова И. А., Донник И. М., Исаева А. Г., Кривоногова А. С. Эколого-биологические особенности крупного рогатого скота в условиях техногенеза. *Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии*. 2015; 2: 366–369. eLIBRARY ID: 23603360.
2. Климов Н. Т., Париков В. А., Слободяник В. И., Шевелева Е. Е., Зимников В. И., Модин А. Н. и др. Роль микробного фактора в возникновении и развитии мастита у коров. *Ветеринария*. 2008; 12: 33–36. eLIBRARY ID: 11920296.
3. Колчина А. Ф. Ветеринарные аспекты снижения соматических клеток в молоке коров. *Аграрный вестник Урала*. 2008; 11 (53): 47–48. eLIBRARY ID: 11750950.
4. Конопельцев И. Г., Шулятьев В. Н., Видякина Е. В., Рылов А. А. Мастит у коров. Часть I. Распространение, этиология, классификация, патогенез: учебное пособие. Киров: Вятская ГСХА; 2006. 72 с.
5. Давыдова Т. Г., Дроздова Л. И. Сравнительная морфология молочной железы высокопродуктивных коров при нисходящем и восходящем маститах. *Аграрный вестник Урала*. 2011; 9 (88): 20–22. eLIBRARY ID: 17849960.
6. Климова Л. А., Ряпосова М. В., Шкуратова И. А., Тарасенко М. Н., Тарасов М., Павлова Н. А. Опыт применения вакцины Стартвак в ООО «Некрасово-1» Свердловской области. *Ветеринария*. 2014; 9: 34–37. eLIBRARY ID: 21916251.
7. Сивкова У. В., Исакова М. Н., Кадочников Д. М. Распространение воспалительных заболеваний матки и вымени высокопродуктивных коров в ведущем племенном заводе Свердловской области. *В кн.: Эколого-биологические проблемы использования природных ресурсов в сельском хозяйстве: материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов*. Екатеринбург; 2017: 336–339. eLIBRARY ID: 29652208.
8. Исакова М. Н., Ряпосова М. В., Опарина О. Ю. Изменения показателей иммунного статуса коров на фоне применения противомаститной вакцины. *Ветеринарный фармакологический вестник*. 2019; 1 (6): 91–95. DOI: 10.17238/issn2541-8203.2019.1.91.

REFERENCES

1. Shkuratova I. A., Donnik I. M., Isayev A. G., Krivonogova A. S. Ecological biological characteristics of cattle in technogenesis. *Issues of Legal Regulation in Veterinary Medicine*. 2015; 2: 366–369. eLIBRARY ID: 23603360. (in Russian)
2. Klimov N. T., Parikov V. A., Slobodianik V. I., Shevelyova Y. Y., Zymnikov V. I., Modin A. N., et al. The role of microbial factor in rise and development of mastitis in cows. *Veterinariya*. 2008; 12: 33–36. eLIBRARY ID: 11920296. (in Russian)
3. Kolchina A. F. Veterinary aspects of lowering a quantity of body cells in cow's milk. *Agrarnyi vestnik Urala*. 2008; 11 (53): 47–48. eLIBRARY ID: 11750950. (in Russian)

4. Konopeltsev I. G., Shulyatiev V. N., Vidyakina E. V., Rylov A. A. Mastitis in cows. Part I. Spread, etiology, classification and pathogenesis [Mastit u korov. Chast' I. Rasprostraneniye, etiologiya, klassifikatsiya, patogenez]: Study guide. Kirov: Vyatskaya GSKhA; 2006. 72 p. (in Russian)

5. Davydova T. G., Drozdova L. I. The comparative morphology of the dairy gland of highly productive cows under descending and ascending mastitis. *Agrarny vestnik Urala*. 2011; 9 (88): 20–22. eLIBRARY ID: 17849960. (in Russian)

6. Pereira U. P., Oliveira D. G., Mesquita L. R., Costa G. M., Pereira L. J. Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: a systematic review. *Vet. Microbiol.* 2011; 148 (2–4): 117–124. DOI: 10.1016/j.vet-mic.2010.10.003.

7. Kehrli M. E. Jr., Shuster D. E. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* 1994; 77 (2): 619–627. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(94)76992-7.

8. Klimova L. A., Ryaposova M. V., Shkuratova I. A., Tarasenko M. N., Tarasov M., Pavlova N. A. Experience of Startvac use on LLC "Nekrasovo-1" against bovine mastitis, Sverdlovsk Region. *Veterinariya*. 2014; 9: 34–37. eLIBRARY ID: 21916251. (in Russian)

9. Sivkova U. V., Isakova M. N., Kadochnikov D. M. The anti-inflammatory diseases of the uterus and udder of high yielding cows in the leading breeding plant in Sverdlovsk Region. In: *Ecological and biological challenges of natural resources exploitation in agriculture [Ekologo-biologicheskie problemy ispol'zovaniya prirodnih resursov v sel'skom hozyajstve]: Proceedings of International Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Specialists*. Ekaterinburg: OOO "IRA UTK"; 2017: 336–339. eLIBRARY ID: 29652208. (in Russian)

10. Isakova M. N., Ryaposova M. V., Oparina O. Yu. Changes in the indices of general resistance of the organism of cows on the background of the use of anti-mastitis vaccines. *Bulletin of Veterinary Pharmacology*. 2019; 1 (6): 91–95. DOI: 10.17238/issn2541-8203.2019.1.91. (in Russian)

Поступила 27.07.2020

Принята в печать 04.09.2020

Received on 27.07.2020

Approved for publication on 04.09.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Исакова Мария Николаевна, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник лаборатории патологии органов размножения и болезней молодняка ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия.

Сивкова Ульяна Владимировна, аспирант ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия.

Ряпосова Марина Витальевна, доктор биологических наук, доцент, заместитель директора по научной работе ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия.

Шкуратова Ирина Алексеевна, доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия.

Лысов Алексей Викторович, кандидат ветеринарных наук, заведующий отделом ветеринарно-лабораторной диагностики с испытательной лабораторией ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия.

Mariya N. Isakova, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Pathology of Reproductive Organs and Diseases of Young Animals, FSBSI UrFASRC UrB of RAS, Ekaterinburg, Russia.

Ulyana V. Sivkova, Post-Graduate Student, FSBSI UrFASRC UrB of RAS, Ekaterinburg, Russia.

Marina V. Ryaposova, Doctor of Science (Biology), Associate Professor, Deputy Director for Science, FSBSI UrFASRC UrB of RAS, Ekaterinburg, Russia.

Irina A. Shkuratova, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Associate Member of the Russian Academy of Sciences, Director, FSBSI UrFASRC UrB of RAS, Ekaterinburg, Russia.

Alexey V. Lysov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of the VLDC, FSBSI UrFASRC UrB of RAS, Ekaterinburg, Russia.

DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-261-265
 УДК 619:616.98:579.873.21:636.2:616-078

К совершенствованию диагностики туберкулеза крупного рогатого скота

М. О. Баратов

Прикаспийский зональный научно-исследовательский ветеринарный институт – филиал ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Республики Дагестан» (Прикаспийский зональный НИВИ – филиал ФГБНУ «ФАНЦ РД»), Республика Дагестан, г. Махачкала, Россия
 e-mail: alama500@rambler.ru

РЕЗЮМЕ

Выявление животных с неспецифическими реакциями на туберкулин – одна из наиболее актуальных проблем в диагностике туберкулеза. Очевидна необходимость поиска и совершенствования методов для выявления причин сенсibilизации. В работе представлены результаты сравнительного изучения различных способов стабилизации эритроцитов с целью получения диагностикума для проведения реакции непрямой гемагглютинации. Отражены этапы стабилизации и сенсibilизации эритроцитов. Показана диагностическая значимость метода стабилизации Филя с использованием формальдегида в качестве фиксатора. Наиболее высокие титры антител (1:3000 и 1:4000) получены в гипериммунных сыворотках крови кроликов, иммунизированных *Mycobacterium bovis*, с гомологичным диагностикумом. Практическая значимость гомологичных заражению сенситинов показана при исследовании 1911 проб сывороток крови животных из хозяйств различных категорий (больные; здоровые, реагирующие на туберкулин; здоровые, не реагирующие на туберкулин) в реакции непрямой гемагглютинации с диагностикумами, изготовленными из *Mycobacterium bovis* и *Mycobacterium fortuitum*. В неблагополучном по заболеванию хозяйстве, на основании полученных в реакции непрямой гемагглютинации позитивных результатов, при проведении патологоанатомического вскрытия диагноз на туберкулез установили у 87,5% животных. Отмечено совпадение результатов реакции непрямой гемагглютинации с показаниями внутрикожной туберкулиновой пробы в 37,7% случаев. У 206 больных туберкулезом животных обнаружены диагностические титры антител при отсутствии реакции на внутрикожную пробу. Однако при проведении патологоанатомического исследования были выявлены изменения туберкулезного характера внутренних органов. Полученные данные указывают на возможность использования реакции непрямой гемагглютинации при выявлении больных туберкулезом животных с неспецифическими реакциями на туберкулин.

Ключевые слова: туберкулез, реакция непрямой гемагглютинации, дифференциация, крупный рогатый скот, стандартизация, антитела, эритроциты, сенсibilизация.

Для цитирования: Баратов М. О. К совершенствованию диагностики туберкулеза крупного рогатого скота. *Ветеринария сегодня*. 2020; 4 (35): 261–265. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-261-265.

Конфликт интересов: Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Баратов Магомед Омарович, доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник, заместитель директора по научной работе, Прикаспийский зональный НИВИ – филиал ФГБНУ «ФАНЦ РД», 367000, Россия, Республика Дагестан, г. Махачкала, ул. Дахадаева, 88, e-mail: alama500@rambler.ru.

UDC 619:616.98:579.873.21:636.2:616-078

Improvement of bovine tuberculosis diagnosis

M. O. Baratov

Caspian Regional Research Veterinary Institute – Branch of Dagestan Agriculture Science Center, Makhachkala, Republic of Dagestan, Russia
 e-mail: alama500@rambler.ru

SUMMARY

Detection of animals with non-specific reactions to tuberculin is one of the major problems in bovine tuberculosis (TB) diagnosis. There is a need to find and improve methods for detection of the sensitization causes. This paper presents the results of comparative studies of different ways to stabilize red blood cells in order to obtain diagnosticums for indirect hemagglutination (IHA) test. The article describes the stages of red blood cells stabilization and sensitization and demonstrates the diagnostic significance of Fili stabilization method using formaldehyde as a fixative. The highest antibody titers (1:3000 and 1:4000) were received in hyperimmune sera of rabbits immunized with *Mycobacterium bovis* using a homologous diagnosticum. Practical importance of the sensitins homologous to the infection is shown during testing of 1,911 serum samples collected from animals of different categories (diseased; healthy and reacting to tuberculin; healthy and not reacting to tuberculin) with IHA test using diagnosticums produced from *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium fortuitum*. Based on the positive results of the IHA test, TB was diagnosed in 87.5% of animals originating from an infected farm during post-mortem examination. The results of the IHA test agreed with those of the intradermal tuberculin test in 37.7% of cases. Diagnostic antibody titers were found in 206 TB infected animals with no reaction to the intradermal test. However, the post-mortem examination revealed TB changes in internal organs. The obtained data suggest a possibility to use the IHA test to detect TB infected animals with non-specific reactions to tuberculin.

Key words: tuberculosis, indirect hemagglutination test, differentiation, cattle, standardization, antibodies, red blood cells, sensitization.

For citation: Baratov M. O. Improvement of bovine tuberculosis diagnosis. *Veterinary Science Today*. 2020; 4 (35): 261–265. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-261-265.

Conflict of interest: The author declares no conflict of interest.

For correspondence: Magomed O. Baratov, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Chief Researcher, Deputy Director for Research, Caspian Regional Research Veterinary Institute – Branch of Dagestan Agriculture Science Center, 367000, Russia, Republic of Dagestan, Makhachkala, ul. Dakhadaeva, 88, e-mail: alama500@rambler.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Часто в неблагополучных по туберкулезу стадах крупного рогатого скота даже после проведения комплексной диагностики остается определенное количество невыявленных больных животных. Имеются данные (хотя и разрозненные) о возможности дополнительного выявления больных туберкулезом животных с использованием серодиагностических методов.

Для обнаружения специфических антител у животных применяли различные серологические реакции: агглютинации, преципитации, связывания комплемента, непрямой и прямой гемагглютинации, иммуноферментный анализ и другие. Однако из-за низкой результативности и частого несовпадения результатов с показаниями аллергической пробы не все они нашли широкое практическое применение.

Реакцию непрямой гемагглютинации для диагностики туберкулеза впервые применил F. I. Awad [1], который использовал в качестве антигена полисахаридный экстракт из *Mycobacterium tuberculosis* штамма H37Rv. Полисахаридный антиген адсорбируют на эритроцитах барана, которые агглютинируют с гомологичными антителами исследуемой сыворотки. В качестве антигена используют: прогретый и диализованный туберкулин [2–8]; туберкулин, полученный путем воздействия ультразвука на микобактерии [9, 10]; фосфатидную фракцию липидов, экстрагированную из микобактерий [11] и т. д.

Поскольку в сыворотке крови животных содержатся гетерогенные гемагглютинины, предложены различные методы их адсорбции путем истощения исследуемых сывороток [12, 13] или обработки эритроцитов раствором танина [14], трипсина или папаина [12].

Известно несколько способов стабилизации эритроцитов, различающихся по химической природе фиксатора и условиям обработки эритроцитов. В качестве фиксатора эритроцитов могут быть использованы альдегиды (например, формальдегид, глutarовый альдегид, ацетальдегид), гидроксаль, четырехокись осмия и другие. Чаще всего используют формальдегид в концентрации от 0,5 до 20%. В некоторых случаях его концентрацию в суспензии эритроцитов повышают постепенно диализом или ступенчато. Длительность фиксации эритроцитов формалином колеблется от 1,5–2,0 до 48 ч.

Противоречивы мнения исследователей и в вопросе определения диагностического титра антител, обнаруживаемого у здорового и больного туберкулезом крупного рогатого скота. Так, J. Komura et al. считают диагностическим титром разведения сывороток крови 1:40 [15], О. В. Мартма – 1:160 [16], Г. В. Дунаев – 1:32 [6], Е. И. Буряк – 1:64 [17], Н. П. Овдиенко – 1:16 [18] и т. д.

Известны различные способы постановки реакции, которые также могут в той или иной степени влиять на результаты исследований.

Таким образом, разнообразие антигенов, методов адсорбции гетерогенных гемагглютининов, стабилизации и сенсибилизации эритроцитов и постановки реакции приводит к противоречивым результатам, что наглядно прослеживается из принятых исследователями разных диагностических титров антител для признания животного больным или здоровым. Поэтому вопрос о диагностической ценности реакции непрямой гемагглютинации для диагностики туберкулеза представляется дискуссионным.

Целью работы было испытание различных способов стабилизации эритроцитов, используемых для сенсибилизации полисахаридным антигеном, определение практической значимости реакции непрямой гемагглютинации с разными диагностикумами в сравнении с другими методами исследования в хозяйствах с различной эпизоотической обстановкой по туберкулезу животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения исследований получали полисахарид из *Mycobacterium bovis* и *Mycobacterium fortuitum*. Для этого навеску сухих клеток каждого штамма измельчали до порошкообразного состояния на шаровой мельнице. Извлечение полисахаридных фракций из бактериальной массы микобактерий производили методом экстрагирования водно-спиртовым раствором бета-нафтола и охлаждением холодным (0 ... –2 °C) этиловым спиртом. Затем антиген отделяли центрифугированием при 3–5 тыс. об/мин, промывали дважды спиртом и эфиром, высушивали в термостате, растирали и переносили во флаконы.

Гипериммунные сыворотки крови были получены от кроликов, иммунизированных *M. bovis*, *M. bovis* bacillus Calmette – Guérin, *M. avium*, *M. scrofulaceum* по методу Фрейда.

Титрование антигенов проводили с использованием гипериммунных сывороток крови перекрестной проверки их по квадратной схеме.

В реакции непрямой гемагглютинации исследовали 1911 проб сыворотки крови, полученной от здорового и больного туберкулезом крупного рогатого скота, а также от животных с неспецифическими реакциями на туберкулин.

Реакцию ставили по общепринятой методике в планшетах типа Titertek, что позволило значительно уменьшить расход и соблюсти точную дозировку компонентов.

Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с межгосударственными стандартами по содержанию и уходу за лабораторными животными

ГОСТ 33216-2014 и ГОСТ 33215-2014, принятыми Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации, а также согласно требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительная оценка методов стабилизации эритроцитов для реакции непрямой гемагглютинации – важное звено в совершенствовании приготовления эритроцитарных диагностикумов. Известно несколько способов стабилизации эритроцитов, при которых в качестве фиксаторов в основном используются альдегиды. Принципиальных различий между ними не существует, так как во всех случаях основными критериями, определяющими качество стабилизации, являются концентрация фиксатора в процессе обработки, соотношение фиксатора и эритроцитов, длительность обработки и температура [19–22]. В целях сравнительного испытания были использованы четыре способа, схема приведена в таблице 1.

Стабилизированные при указанных в таблице 1 режимах бараньи эритроциты проверяли на самопроизвольную агглютинацию в инактивированной сыворотке крови и использовали для сенсibilизации полисахаридами. Сенсibilизацию эритроцитов проводили путем смешивания различных разведений (от 1:500 до 1:4000) полисахаридов с 10%-й взвесью стабилизированных эритроцитов в соотношении 1:4 и инкубировали при 38 °C в течение 12 ч при постоянном встряхивании в аппарате Vibrotherm. Эритроциты дважды отмывали и готовили 2%-ю взвесь в фосфатно-буферном физиологическом растворе с добавлением 1%-й нормальной инактивированной истощенной сыворотки крови крупного рогатого скота. В зависимости от разведения полисахаридов, предназначенных для сенсibilизации эритроцитов (от 1:500 до 1:4000 с интервалом 1:500), подготовили 32 варианта диагностикума.

Для титрования антигенов использовали 2 позитивные и 2 негативные сыворотки крови. Их разводили фосфатно-буферным физиологическим раствором в соотношении 1:4 и инактивировали в водяной бане при 64 °C в течение 30 мин. Для адсорбции гетерогенных гемагглютининов в каждую сыворотку добавляли 5%-ю взвесь эритроцитов барана и выдерживали на водяной бане при температуре 37–38 °C один час, периодически встряхивая. Затем эритроциты отделяли от сыворотки центрифугированием.

Реакцию ставили в планшетах для иммуноферментного анализа по общепринятой методике, соответственно десятикратно уменьшив объемы компонентов. Каждую пробу диагностикумов проверяли в реакции с разведениями сывороток до 1:2048. Исследования проводили с негативными и позитивными сыворотками крови, а также использовали по одной гипериммунной сыворотке крови кроликов, иммунизированных *M. avium* и *M. scrofulaceum*.

В каждую лунку планшета к 0,05 мл разведенных сывороток крови добавляли по 0,02 мл 2%-й взвеси сенсibilизированных эритроцитов. В 11-ю лунку вносили сыворотку в разведении 1:8 и 0,02 мл диагностикума (контроль истощения сыворотки). В 12-й лунке ставили контроль спонтанной агглютинации эритроцитарного диагностикума (0,05 мл буфера + 0,02 мл диагностикума). Титром антигена считали разведение, при котором наблюдалась агглютинация в три креста с позитивной сывороткой и четыре креста с гипериммунной анти-сывороткой.

При всех разведениях антигена в реакции с сыворотками крови контрольных кроликов и здоровых животных из благополучных по туберкулезу стад гемагглютинины с диагностикумом, изготовленным из *M. fortuitum*, не были обнаружены. С диагностикумом из *M. bovis* при стабилизации эритроцитов по методу ВИЭВ (Всесоюзный институт экспериментальной ветеринарии) в титрах 1:500 и 1:1000 гемагглютинины были выявлены в разведении сывороток 1:32. В 193 пробах сывороток крови заведомо здоровых животных гемагглютинины в более высоких титрах обнаружить не удалось. Наиболее высокие титры антител были получены в гипериммунных сыворотках крови кроликов, иммунизированных *M. bovis*, с гомологичным диагностикумом в разведениях 1:3000 и 1:4000 при стабилизации эритроцитов методом Фили. При этом антитела были выявлены в разведениях сывороток 1:4096. В этих разведениях диагностикумов, приготовленных стабилизацией эритроцитов тремя другими способами, гемагглютинины были установлены в разведениях сывороток 1:1024. В то же время разница между титрами антител в гомологичных антигену из *M. bovis* гипериммунных сыворотках и в гетерологичных была наиболее высокой при стабилизации эритроцитов по методу Фили. Так, с диагностикумом из *M. bovis* с гомологичной сывороткой выявили гемагглютинацию в титре 1:4096, тогда как с сыворотками крови кроликов, иммунизированных *M. avium*, – в титре 1:1024, *M. scrofulaceum* – 1:256 и *M. bovis* bacillus Calmette – Guérin – 1:1024.

Таблица 1
Различные способы и режимы стабилизации эритроцитов

Table 1
Different methods and procedures for red blood cells stabilization

№ п/п	Метод	Фиксатор	Концентрация фиксатора в процессе обработки, %	Соотношение фиксатора и эритроцитов	Длительность обработки, ч	Температура, °C
1	Фили	Формальдегид	5,7	0,32:1	2	37
2	Вайнбах	Формальдегид	1,5	0,375:1	18–20	37
3	Линг	Формальдегид	4,4	0,75:1	24	4
4	ВИЭВ	Глутаровый альдегид	2,5	0,5:1	18–20	37

Обратная картина наблюдалась в реакции непрямой гемагглютинации с диагностикумом, изготовленным из *M. fortuitum*. Наиболее высокие титры антител (1:2048) в этом случае установили в реакции с сывороткой крови кроликов, иммунизированных *M. scrofulaceim*. Основываясь на этих результатах, за титр антигена было принято разведение 1:1500 (удвоенный титр) при стабилизации эритроцитов по методу Фили.

Диагностикумы стандартизировали в реакции непрямой гемагглютинации с сыворотками с известными титрами антител, затем их расфасовали в ампулы по 5 мл и использовали для постановки реакции непрямой гемагглютинации по мере необходимости.

Производственное испытание проводили на животных четырех хозяйств с различной эпизоотической обстановкой по туберкулезу. В первом хозяйстве (туберкулезный изолятор) к моменту исследований на внутрикожную туберкулиновую пробу реагировали 75,6% животных. Во втором хозяйстве (длительно неблагополучном) оздоровление проводилось по результатам систематических исследований путем изолирования и сдачи на убой реагирующих животных. Было установлено, что в данном хозяйстве на туберкулиновую пробу реагировало 3,9% животных. В третьем хозяйстве при плановых исследованиях выявляли реагирующих животных (в наших исследованиях реагировало 6,5%), но диагноз на туберкулез при контрольном убое и осмотре внутренних органов, а также при проведении лабораторных исследований материалов от таких животных установлен не был. Четвертое хозяйство – благополучное, в нем реагирующие на туберкулин животные отсутствовали.

От животных этих хозяйств были взяты 1911 проб крови для получения сыворотки, которую исследовали в реакции непрямой гемагглютинации с изготовленными из *M. bovis* и *M. fortuitum* диагностикумами. Результаты представлены в таблице 2.

Результаты свидетельствуют о выраженной разнице между количеством животных с позитивными показателями, выявленными в реакции непрямой гемагглютинации с диагностикумом из *M. bovis*, и количеством животных, протестированных диагностикумом из *M. fortuitum*, в неблагополучных по туберкулезу хозяйствах. В первых двух хозяйствах большее количество проб сывороток крови с диагностическим титром антител было выявлено при использовании диагностикума

на основе *M. bovis*, чем при использовании диагностикума из *M. fortuitum*. Напротив, при исследовании сывороток крови животных из третьего хозяйства большее количество выявлений получено с диагностикумом на основе *M. fortuitum*. В то же время в группе передержки в реакции непрямой гемагглютинации с использованием диагностикума *M. bovis* позитивные показания установили только у 15% исследованных животных.

Во всех четырех хозяйствах с диагностической целью произвели убой животных с позитивными и негативными показаниями, полученными в реакции непрямой гемагглютинации. При этом диагноз на туберкулез установили у 87,5% животных из неблагополучных по заболеванию хозяйств, показавших позитивные результаты в реакции непрямой гемагглютинации. При патологоанатомическом исследовании и проведении лабораторной диагностики биологического материала от животных с неспецифическими реакциями на туберкулин характерных для туберкулеза изменений внутренних органов не обнаружено, заболевание не установлено. В 22,1% случаев из материалов выделили культуры атипичных микобактерий.

При сопоставлении результатов исследований, полученных методом внутрикожной туберкулиновой пробы и в реакции непрямой гемагглютинации, выявили совпадение позитивных показаний в 37,7% случаев. В то же время у 5 животных в изоляторе и 201 из неблагополучного хозяйства были обнаружены диагностические титры антител при отсутствии реакции на внутрикожную пробу. При диагностическом убое и проведении патологоанатомического исследования внутренних органов 20 животных из неблагополучного хозяйства и 5 животных из группы передержки туберкулез был установлен в 75 и 100% случаев соответственно. Следовательно, реакция непрямой гемагглютинации расширяет возможности диагностики туберкулеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальные исследования и практический опыт использования серодиагностики при туберкулезе обогащают знания дополнительной информацией об иммунном состоянии организма животных. Имеющиеся в литературных источниках данные по использованию серологических реакций (реакции связывания комплемента, реакции непрямой гемагглютинации и др.) с применением различных антигенов для выявления больных туберкулезом животных противоречивы и имеют разрозненный характер. Полученные при проведении данного исследования результаты свидетельствуют о том, что эффективность применения серологических реакций находится в прямой зависимости от качества антигена и способа его использования, а в данном случае – способа sensibilization эритроцитов, и согласуются с данными других исследователей. Проведенные исследования показали, что лучшим для sensibilization эритроцитов является способ Фили, при котором получили более высокие титры антител с гомологичными сыворотками по сравнению с гетерологичными. Логично предположить, что реакция непрямой гемагглютинации с различными микобактериальными диагностикумами позволит выявить причину sensibilization макроорганизма к туберкулину. Исследования сывороток крови животных, sensibilized атипичными микобактериями, показали, что количество животных с позитивными

Таблица 2
Результаты исследования проб сывороток крови от животных из различных хозяйств в реакции непрямой гемагглютинации

Table 2
Results of IHA tests of serum samples collected from animals originating from different farms

Номер хозяйства	Количество проб сывороток крови	Обнаружены антитела с диагностикумом из:			
		<i>M. bovis</i>		<i>M. fortuitum</i>	
		количество	%	количество	%
1	180	27	15	2	1,1
2	1016	206	20,3	73	7,2
3	522	43	8,2	79	15,1
4	193	–	–	–	–

результатами в реакции непрямой гемагглютинации с диагностикумом, изготовленным из *M. fortuitum*, было значительно больше, чем с диагностикумом из *M. bovis*. В неблагополучных по туберкулезу хозяйствах наблюдалась обратная картина – сравнительно малая эффективность при исследовании сывороток крови от больных туберкулезом животных в реакции непрямой гемагглютинации с диагностикумом из гетерологичных микобактерий, вероятно, связана с подавлением иммунной системы развитым туберкулезным процессом.

Таким образом, представленные результаты характеризуют эффективность использования диагностикумов, изготовленных из гомологичных заражению микобактерий, для дифференциации неспецифических реакций на туберкулин и расширяют представления о механизмах усвершенствования диагностики туберкулеза животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

(п. п. 1–4, 7, 11, 13–15, 20–22 см. REFERENCES)

5. Буряк Е. И. Сравнительное изучение диагностической ценности РНГА, РГА, РДСК и диффузионной преципитации в агаровом геле при туберкулезе КРС. *Профилактика и лечение заболеваний сельскохозяйственных животных на юге Украины: сборник статей*. Одесса; 1963: 52.
6. Дунаев Г. В. Изучение компонентов туберкулезных микобактерий, наиболее пригодных для сенсибилизации эритроцитов при постановке РНГА, РГА и РГ. *Ветеринария. Республиканский межведомственный тематический научный сборник*. Киев: Урожай; 1965: 7: 121.
8. Шамардин В. А., Тугамбаев Т. И. Диагностические сортированные иммунореагенты. Алма-Ата: Наука КазССР; 1989. 157 с.
9. Кузин А. И. Серологическая диагностика туберкулеза КРС. *Труды ВИЭВ*. 1967; 33: 325–331.
10. Кныш В. С. Диагностическое значение серологических реакций при туберкулезе КРС. *Тваринництво України*. 1968; 8: 25.
12. Дунаев Г. В. Серологическая диагностика туберкулеза КРС с неспецифическими аллергическими реакциями. *Вестник сельскохозяйственной науки*. 1958; 9: 48.
16. Марта О. В. Атипичные микобактерии и их диагностическое и эпизоотическое значение при туберкулезе КРС: автореф. дис. ... д-ра вет. наук. Тарту; 1971. 46 с.
17. Буряк Е. И. Изучение титра гуморальных антител при серологической диагностике туберкулеза крупного рогатого скота: автореф. дис. ... канд. вет. наук. Одесса; 1969. 20 с.
18. Овдиенко Н. П. Парааллергические реакции на туберкулин у крупного рогатого скота, инфицированного микобактериями паратуберкулеза. *Труды ВИЭВ*. 1985; 62: 64–69.
19. Дорошко В. П. Специфическая стимуляция при серологической диагностике туберкулеза крупного рогатого скота: автореф. дис. ... канд. вет. наук. Киев; 1971. 20 с.

REFERENCES

1. Awad F. I. The inter-relationship between tuberculosis and bovine farcy. *J. Comp. Pathol. Therap.* 1958; 68 (3): 324–330. DOI: 10.1016/s0368-1742(58)80034-x.
2. Baess I., Mansa B. Determination of genome size and base ratio on deoxyribonucleic acid from mycobacteria. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B*. 1978; 86B (5): 309–312. DOI: 10.1111/j.1699-0463.1978.tb00049.x.
3. Runyon E. H. Anonymous mycobacteria in pulmonary diseases. *Med. Clin. North Am.* 1959; 43 (1): 273–290. DOI: 10.1016/s0025-7125(16)34193-1.
4. Schlisser T. Tuberculose bei Homs und Wildtieren. *Prax. Pneum.* 1974; 28 (9): 511–515.
5. Buryak E. I. Comparative studies of diagnostic value of IHA test, HA, prolonged CFT and agar gel diffusion precipitation for bovine tuberculosis

[Srvnitel'noe izuchenie diagnosticheskoy cennosti RNGA, RGA, RDSK i difuzionnoj precipitacii v agarovom gele pri tuberkuleze KRS]. *Prevention and treatment of livestock diseases in the south of Ukraine [Proflaktika i lechenie zabolevanij sel'skoxozyajstvennyh zhivotnyh na yuge Ukrainy]: collected works*. Odessa; 1963; 52. (in Russian)

6. Dunayev G. V. Study of Mycobacterium tuberculosis components that are most suitable for red blood cells sensitization in IHA test, HA and hemolysis assay [Izuchenie komponentov tuberkuleznyh mikobakterij, naibolee prigodnyh dlya sensibilizacii eritrocitov pri postanovke RNGA, RGA i RG]. *Veterinary Medicine. Republic Interministerial Thematical Scientific Collected Works [Veterinariya. Respublikanskij mezhdostvennyj tematicheskij nauchnyj sbornik]*. Kiev: Urozhai; 1965; 7: 121. (in Russian)
7. Fraeser D. W. Bacteria newly recognized as nosocomial pathogens. *Am. J. Med.* 1981; 70 (2): 432–438. DOI: 10.1016/0002-9343(81)90784-1.
8. Shamardin V. A., Tugambayev T. I. Diagnostic sorted immunological reagents [Diagnosticheskie sortirovannye immunoreagenty]. Almaty: Nauka KazSSR; 1989. 157 p. (in Russian)
9. Kuzin A. I. Serological diagnosis of bovine tuberculosis [Serologicheskaya diagnostika tuberkuleza KRS]. *Trudi VIEV*. 1967; 33: 325–331. (in Russian)
10. Knysh V. S. Diagnostic significance of serological reactions for bovine tuberculosis [Diagnosticheskoe znachenie serologicheskikh reakcij pri tuberkuleze KRS]. *Tvarinnitsvo Ukraini*. 1968; 8: 25. (in Russian)
11. Corner L. A. The duration of the response of cattle to inoculation with atypical mycobacteria. *Austral. Vet. J.* 1981; 57 (5): 216–219. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1981.tb02662.x.
12. Dunayev G. V. Serological diagnosis of bovine tuberculosis with non-specific allergic reactions [Serologicheskaya diagnostika tuberkuleza KRS s nespecificheskimi allergicheskimi reakcijami]. *Bulletin of Agricultural Science [Vestnik sel'skoxozyajstvennoj nauki]*. 1958; 9: 48. (in Russian)
13. Cummins C. S., Harris H. Studies on the cell-wall composition and taxonomy of Actinomycetales and related groups. *J. Gen. Microbiol.* 1958; 18 (1): 173–189. DOI: 10.1099/00221287-18-1-173.
14. Hugh R, Leifson E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *J. Bacteriol.* 1953; 66 (1): 24–26. DOI: 10.1128/JB.66.1.24-26.1953.
15. Komura J., Yamada K., Otsuka S.-I., Komagata K. Taxonomic significance of phospholipids in coryneform and nocardioform bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 1975; 21 (4): 251–261. DOI: 10.2323/jgam.21.251.
16. Marta O. V. Atypical mycobacteria and their diagnostic and epizootic significance for bovine tuberculosis [Atipichnye mikobakterii i ih diagnosticheskoe i epizooticheskoe znachenie pri tuberkuleze KRS]: thesis abstract Doctor of Science (Veterinary Medicine). Tartu; 1971. 46 p. (in Russian)
17. Buryak E. I. Study of humoral antibody titer during serological diagnosis of bovine tuberculosis [Izuchenie titra gumoral'nyh antitel pri serologicheskoy diagnostike tuberkuleza krupnogo rogatogo skota]: thesis abstract Candidate of Science (Veterinary Medicine). Odessa; 1969. 20 p. (in Russian)
18. Ovdienko N. P. Parallergic reactions to tuberculin in cattle infected with Mycobacterium paratuberculosis [Paraallergicheskie reakcii na tuberkulin u krupnogo rogatogo skota, inficirovannogo mikobakterijami paratuberkuleza]. *Trudi VIEV*. 1985; 62: 64–69. (in Russian)
19. Dorozhko V. P. Specific stimulation during serological diagnosis of bovine tuberculosis [Specificheskaya stimulaciya pri serologicheskoy diagnostike tuberkuleza krupnogo rogatogo skota]: thesis abstract Candidate of Science (Veterinary Medicine). Kiev; 1971. 20 p. (in Russian)
20. Tsukamura M. Differentiation between the genera *Mycobacterium*, *Rhodococcus* and *Nocardia* by susceptibility to 5-fluorouracil. *J. Gen. Microbiol.* 1981; 125 (1): 205–208. DOI: 10.1099/00221287-125-1-205.
21. Thorel M. F. Tuberculose de la chèvre: diagnostic biologique [Tuberculosis of the goat: biological diagnosis (author's transl.)]. *Annales de Recherches Vétérinaires*. 1980; 11 (3): 251–257. PMID: 7259030. (in French)
22. Wolinsky E., Ryneason T. K. Mycobacteria in soil and their relation to disease-associated strains. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1968; 97 (6): 1032–1037. DOI: 10.1164/arrd.1968.97.6P1.1032.

Поступила 25.06.2020

Принята в печать 28.08.2020

Received on 25.06.2020

Approved for publication on 28.08.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ / INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Баратов Магомед Омарович, доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник, заместитель директора по научной работе, Прикаспийский зональный НИВИ – филиал ФГБНУ «ФАНЦ РД», г. Махачкала, Республика Дагестан, Россия.

Magomed O. Baratov, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Chief Researcher, Deputy Director for Research, Caspian Regional Research Veterinary Institute – Branch of Dagestan Agricultural Science Center, Makhachkala, Republic of Dagestan, Russia.

Выявление бактерий *Helicobacter suis* у свиней разных возрастных групп

Ф. М. Нурғалиев

ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана» (ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ), г. Казань, Россия
ORCID 0000-0001-7496-0379, e-mail: nurgalievfm@gmail.com

РЕЗЮМЕ

В настоящее время патогенез язвенной болезни желудка свиней остается в значительной степени неизученным. Возникновение данной патологии наиболее часто связывают с типом и технологией кормления, стрессами и нарушениями гомеостаза организма животных. Сравнительно недавно исследователями было выдвинуто предположение о возможном участии бактерий рода *Helicobacter* в развитии хронического гастрита и язвенной болезни свиней. В статье приводятся результаты исследований по выявлению *Helicobacter suis* и степени обсемененности слизистой оболочки желудка свиней разных возрастных групп. Материалом для исследования служили желудки, полученные от молочных поросят, откормочных свиней и свиноматок в убойном пункте Республики Марий Эл. Определена зависимость выявленных патоморфологических изменений слизистой оболочки желудка свиней от наличия *H. suis*, обнаруженной в микроскопических и биохимических тестах, а также с помощью полимеразной цепной реакции. Так, выраженных патоморфологических изменений на слизистой желудка молочных поросят выявлено не было. У откормочных свиней и свиноматок, у которых было установлено инфицирование бактериями *H. suis*, на слизистой оболочке желудка обнаруживали выраженный гиперкератоз, эрозии и язвы. Также у свиноматок наблюдали язвенные поражения нежелезистой части желудка в области пищевода отверстия. У молочных поросят ДНК бактерий *H. suis* была выделена только в биоматериале из пилорического отдела желудка, тогда как у откормочных свиней наиболее часто ДНК обнаруживали в фундальном отделе, а у свиноматок – в фундальном и кардиальном отделах. Это указывает на сдвиг колонизации хеликобактериями слизистой оболочки желудка от пилорического к кардиальному отделу с увеличением возраста животного. Полученные данные представляют дополнительные доказательства этиологической роли *H. suis* в патогенезе язвенной болезни желудка свиней.

Ключевые слова: *Helicobacter suis*, слизистая оболочка желудка, свиньи, лабораторная диагностика.

Благодарность: Автор благодарит кафедру микробиологии Казанской государственной медицинской академии – филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России за предоставленные возможности для проведения исследовательской работы.

Для цитирования: Нурғалиев Ф. М. Выявление бактерий *Helicobacter suis* у свиней разных возрастных групп. *Ветеринария сегодня*. 2020; 4 (35): 266–271. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-266-271.

Конфликт интересов: Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Нурғалиев Фарит Муллағалиевич, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ, 420029, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Сибирский тракт, 35, e-mail: nurgalievfm@gmail.com.

UDC 616.98:579.835.12:636.4:616-078

Detection of *Helicobacter suis* bacteria in pigs of different age groups

F. M. Nurgaliev

FSBEI HE "Kazan State Academy of Veterinary Medicine n. a. N. E. Bauman", (FSBEI HE Kazan SAVM), Kazan, Russia
ORCID 0000-0001-7496-0379, e-mail: nurgalievfm@gmail.com

SUMMARY

Currently, the pathogenesis of gastric ulcer in pigs remains largely unexplored. The origin of this pathology is most often associated with the type and the technologies of feeding, stresses and disorders of homeostasis of the animal body. The possible involvement of bacteria of the genus *Helicobacter* in the development of chronic gastritis and gastric ulcer disease in pigs was suggested by the researchers relatively recently. The article comprises the results of investigations aimed at detection of *Helicobacter suis* bacteria and the contamination degree of porcine gastric mucosa in pigs of different age groups. The stomachs, obtained from suckling pigs, fattening pigs and sows in the slaughterhouse of the Mari El Republic, were examined. The study determined the dependence of pathomorphological changes in the gastric mucosa of pigs on the detection of *H. suis* in microscopic and biochemical tests as well as in PCR. Thus, no pathomorphological changes in the gastric mucosa of suckling pigs were detected. Severe hyperkeratosis, erosions, and ulcers were found on the stomach mucosa of fattening pigs and sows that were infected with *H. suis* bacteria. Sows also had ulcerative lesions in the non-glandular region of esophagus. In the biomaterial of suckling piglets the DNA of *H. suis* bacteria was found only in the pyloric region of the stomach, while in fattening pigs, the DNA of these bacteria was most often isolated from the fundal region, and in sows – from

the fundal and cardial regions. This indicates a shift in colonization by helicobacters of the mucous membrane of the stomach from the pyloric to the cardiac section increased with animal age. The obtained research data provide the additional evidence of the etiological role of *H. suis* in the pathogenesis of gastric ulcer in pigs.

Key words: *Helicobacter suis*, gastric mucosa, pigs, laboratory diagnostics.

Acknowledgements: The author is grateful to the Department of microbiology of the Kazan State Medical Academy – Branch Campus of the FSBEI FPE RMACPE MOH Russia for provided opportunity to perform the research activities.

For citation: Nurgaliev F. M. Detection of *Helicobacter suis* bacteria in pigs of different age groups. *Veterinary Science Today*. 2020; 4 (35): 266–271. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-266-271.

Conflict of interest: The author declares no conflict of interests.

For correspondence: Farit M. Nurgaliev, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, FSBEI HE Kazan SAVM, 420029, Russia, Republic of Tatarstan, Kazan, Sibirsky trakt, 35, e-mail: nurgalievfm@gmail.com.

ВВЕДЕНИЕ

Helicobacter suis – спиралевидная грамотрицательная бактерия диаметром 0,6–0,8 мкм и длиной 2,3–6,7 мкм, образующая от 4 до 8 тесно расположенных завитков. Периплазматических фибрилл не имеет. Для бактерий данного вида характерна активная подвижность, тип жгутикования – амфитрихальный, на обоих концах имеются от 4 до 10 жгутиков, которые заканчиваются либо тупыми концами, либо сферическими, причем сферический конец в два раза больше среднего диаметра жгутика. *H. suis* капсул и спор не образует [1, 2].

Для культивирования *H. suis* применяют следующие среды: агар для выращивания бруцелл, мясо-печеночный пептонный агар (МППА), мясо-пептонный агар (МПА), дополненные 20%-й фетальной телячьей сывороткой или 10%-й дефибрированной кровью лошади. Посевы культивируют в микроаэрофильных и капнофильных условиях при 37 °C в течение 5–7 суток. В анаэробных условиях инкубации наблюдается слабый рост бактерий. При культивировании на питательных средах спираллоподобные формы трансформируются в кокковидные [1, 3].

Возможное участие *H. suis* в развитии хронического гастрита пилорического отдела желудка свиней предположили в конце XX в., когда в 1990 г. М. М. Queiroz et al. в своей статье описали спиральный организм, обнаруженный при микроскопическом исследовании мазков, отобранных из желудков свиней [4]. Затем последовали работы Е. N. Mendes et al. [5], М. М. Queiroz et al. [6], С. De Witte et al. [7] и других авторов, которые изучали взаимосвязь между наличием бактерий в слизистой желудка и язвенной болезнью желудка свиней. Однако G. M. Grasso et al. [8], S. I. Melnichouk et al. [9] данной связи не выявили.

Необходимо также отметить, что на данный момент *H. suis* – наиболее распространенный после *H. pylori* вид хеликобактерий у человека, способных вызвать заболевания желудочно-кишечного тракта [10–12]. В настоящее время общепринятой является точка зрения, согласно которой *H. pylori* служит важным фактором риска развития хронического гастрита у людей. Изучение данного вида бактерий привело к принципиальному изменению в подходах лечения язвенной болезни человека. В частности, проведение профилактических мероприятий в Москве привело в 2016 г. к снижению заболеваемости язвенной болезнью на 77% и распро-

страненности этого заболевания на 64% по сравнению с 1994 г. [10]. Значительный интерес вызывает эрадикация *H. pylori* в качестве стратегии профилактики рака желудка у человека при атрофическом гастрите типа В. Во многом благодаря этому в Западной Европе, США и Японии отмечено значительное снижение заболеваемости раком желудка [10, 13].

Однако у свиней патогенез язвенной болезни желудка остается в значительной степени неизученным [7]. Возникновение заболевания в основном связывают с такими факторами, как рацион, размер частиц корма, постоянным стрессом и нарушениями гомеостаза организма. В организме животных многочисленные язвенные процессы наблюдаются при нарушении обмена веществ, алиментарной дистрофии, отравлениях, инфекционных заболеваниях (ящур, некробактериоз, туберкулез). Предрасполагающими факторами считают: подкармливание сульфатом или карбонатом меди, кормление только пищевыми отходами, а также токсичными, перекисными кормами, дефицит в рационе белков и селена, нарушение соотношения основных и кислых эквивалентов, авитаминоз. Ряд авторов указывают на то, что у свиней определенную роль в патогенезе язвенной болезни желудка играют бактерии *H. suis*, которые вызывают гиперкератоз, эрозии и образование язв. В публикациях приводятся различные данные о распространении бактерий данного вида среди поголовья свиней. Так, например, Е. N. Mendes et al. [5] обнаружили *H. suis* в 10,8% случаев, М. М. Queiroz et al. [6] – в 90%, А. Hellemans et al. [14] – в 80%. На сегодняшний день можно заключить, что распространенность бактерий *H. suis* среди свиней варьирует от 10,8 до 90,0%, но в большинстве исследований сообщают, что данный показатель составляет 60% [2, 7, 11].

Влияние на здоровье животных, экономические потери для свиноводческой промышленности и зоонозное значение бактерий *H. suis* обосновывают необходимость детального изучения самого микроорганизма и эпидемиологии вызываемых им поражений [2, 3, 15, 16].

Целью данной работы являлось выявление бактерий *H. suis*, определение степени обсемененности слизистой оболочки желудка (СОЖ) свиней разных возрастных групп и сопоставление патоморфологических изменений в слизистой оболочке со степенью колонизации ее хеликобактериями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили желудки, полученные от 5 молочных поросят 1–2-месячного возраста, 20 откормочных свиней в возрасте 8–10 месяцев и 4 свиноматок в возрасте 3 лет породы крупная белая. Все свиньи поступили в специализированный убойный пункт из одного хозяйства Республики Марий Эл в течение одной рабочей смены.

После предубойного осмотра животных, проведенного государственным ветеринарным специалистом, к убою допускали только здоровых животных. В условиях убойного пункта извлеченные желудки вскрывали по большой кривизне и промывали стерильной водой. Патоморфологические изменения СОЖ оценивали по методу М. J. Hessing et al. [17], которые предложили использовать шкалу от 0 до 5, где 0 – неповрежденная слизистая оболочка; 1 – умеренный гиперкератоз, охватывающий менее 50% поверхности; 2 – тяжелый гиперкератоз с охватом более 50% поверхности; 3 – гиперкератоз и несколько небольших эрозий (менее 5 точечных повреждений площадью 2,5 см²); 4 – гиперкератоз и обширные эрозии (более 5 повреждений и/или более 2,5 см²); 5 – гиперкератоз, большие эрозии (более 10 повреждений или более 5 см²) и/или язвы.

Для оценки степени обсеменения микроорганизмами СОЖ кардиального, фундального и пилорического отделов желудка свиней готовили мазки-отпечатки, которые окрашивали по Граму. Уровень контаминации определяли полуколичественным методом по трем степеням: I – до 10, II – от 10 до 20, III – более 20 микробных тел в поле зрения светового микроскопа при увеличении $\times 1000$ [18].

Результаты микроскопических исследований подтверждали постановкой CLO-теста, принцип которого основан на свойстве бактерий семейства *Helicobacter* выделять фермент уреазу, катализирующий процесс преобразования мочевины в аммиак и углекислый газ. В результате происходящей при постановке данного теста реакции pH среды сдвигается в щелочную сторону, что определяется с помощью индикатора. Скорость изменения окраски индикатора зависит от уреазной активности, которая, в свою очередь, зависит от количества бактерий. Таким образом можно косвенно оценить степень колонизации СОЖ *H. suis* – чем выше степень обсеменения, тем быстрее происходит изменение окраски индикатора. Для проведения теста стерильно отбирали биоптаты (5 $\times$ 5 мм) из упомянутых участков СОЖ в первые 10 мин после забоя и помещали в пробирки с реагентами. Учет результатов CLO-теста производили через 1, 3 и 24 ч, оценивая скорость изменения окраски раствора.

Специфическое определение бактерий *H. suis* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) согласно описанию D. De Groote et al. [19]. Для этого отбирали образцы слизистой кардиального, фундального и пилорического отделов желудков в пробирки типа эппендорф. Геномную ДНК из биоматериала экстрагировали с использованием набора реагентов «ДНК-СОРБЕНТ» (ООО НПФ «Литех», Москва) в соответствии с инструкцией производителя. Определяемые участки гена 16S рДНК *H. suis* размером 433 п. о. Видоспецифическую ПЦР проводили с применением праймеров V832f TTGGGAGGCTTTGTCTTTCCA и V1261r GATTAGCTCTGCCTCGCGGCT, предложенных

D. De Groote et al. [19], по следующей программе: 94 °C – 4 мин; 94 °C – 30 сек, 60 °C – 60 сек, 72 °C – 10 сек в течение 40 циклов. Выявление продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза путем их электрофоретического разделения в 2%-м агарозном геле с добавлением бромистого этидия и флуоресцентной визуализацией в УФ-трансиллюминаторе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Макроскопическая оценка состояния СОЖ молочных поросят показала, что в 3 образцах слизистой не была повреждена (0 баллов по методу J. J. C. Hessing et al.), в 2 образцах отмечали умеренный гиперкератоз, охватывающий менее 50% поверхности (1 балл). При исследовании состояния СОЖ откормочных свиней выявили, что в 1 образце слизистая оболочка была неповрежденной (0 баллов), в 5 образцах наблюдали умеренный гиперкератоз (1 балл), в 6 образцах – тяжелый гиперкератоз (2 балла), в 4 образцах – гиперкератоз и несколько небольших эрозий (3 балла), в 3 образцах – гиперкератоз и обширные эрозии (4 балла), в 1 образце – гиперкератоз и большие эрозии (5 баллов). Состояние СОЖ свиноматок характеризовалось в 1 образце тяжелым гиперкератозом (2 балла), в 2 образцах – гиперкератозом и несколькими небольшими эрозиями (3 балла) и в 1 образце – гиперкератозом и обширными эрозиями (4 балла).

В условиях убойного пункта из всех полученных желудков были изготовлены мазки-отпечатки СОЖ для первичной микроскопии. В неповрежденных желудках фрагменты СОЖ брали из кардиального и фундального отделов по большой и малой кривизне; из пилорического отдела – по вершинам воображаемого равно-стороннего треугольника с привратником в центре (на расстоянии 2–4 см от него). В желудках с выявленными патологоанатомическими изменениями – из пораженных мест. Полученный биоматериал помещали в пробирки с тиогликолевой средой и осуществляли транспортировку в течение не более 2–3 часов в термосумке с хладоэлементом.

При изучении мазков-отпечатков СОЖ молочных поросят микроорганизмов с характерными для хеликобактерий формами выявлено не было.

При микроскопировании мазков-отпечатков СОЖ откормочных свиней в 8 из 20 желудков на фоне окрашенной слизи были обнаружены изогнутые, спиралевидные граммотрицательные палочки диаметром от 0,2 до 0,8 мкм и длиной от 2 до 5 мкм. Микроорганизмы с характерными для *H. suis* формами были обнаружены в 8 пробах из фундального отдела желудков и в 4 пробах из пилорического отдела, в кардиальном отделе подобных бактерий выявлено не было. В 5 пробах слизистой оболочки фундального отдела желудков установили II степень обсеменения микроорганизмами, в 3 пробах – III степень. В мазках-отпечатках СОЖ пилорического отдела регистрировали II степень обсеменения в 4 пробах.

При изучении мазков-отпечатков СОЖ свиноматок в 1 из 4 желудков были обнаружены микроорганизмы с характерными для *H. suis* формами. В кардиальном и фундальном отделах этого желудка установили II степень обсеменения слизистой оболочки, в мазке-отпечатке из пилорического отдела желудка характерные микроорганизмы обнаружены не были.

Уреазную активность испытуемых образцов выявляли, используя CLO-тест. Степень обсеменения СОЖ *H. suis* в тесте оценивали по скорости изменения цвета индикатора в течение 24 ч. Если окрашивание раствора изменялось в течение 1 ч, это свидетельствовало о значительной инфицированности слизистой желудка микроорганизмом, от 1 до 3 ч – умеренной инфицированности, от 3 до 24 ч – незначительном содержании *H. suis* в исследуемом биоптате (табл. 1). При невысокой степени обсемененности СОЖ уреазная активность может быть незначительной, поэтому существует вероятность получения ложноотрицательного результата. Следует отметить, что CLO-тест является косвенным методом, т. к. выявляет не хеликобактерии, а лишь уреазную активность, которую могут проявлять и другие бактерии, например протеи.

Представленные в таблице 1 данные исследований свидетельствуют о высокой степени уреазной активности, выявленной в образцах желудков, полученных от откормочных свиней. В биоптатах из желудков молочных поросят уреазной активности выявлено не было.

Биоматериал, отобранный из разных отделов желудков свиней, протестировали методом ПЦР с помощью видоспецифических к *H. suis* праймеров V832f и V1261r. Результаты исследований слизистой кардиального, фундального и пилорического отделов желудков на наличие ДНК *H. suis* представлены в таблице 2.

Как видно из таблицы 2, у одного молочного поросенка ДНК *H. suis* была обнаружена в биоматериале, взятом из пилорического отдела желудка. Геном *H. suis* был выделен в слизистой 17 из 20 желудков откормочных свиней, при этом в 4 случаях в СОЖ кардиального отдела, в 15 случаях – пилорического отдела и 17 случаях – фундального отдела (итого 36 положительных проб). При исследовании материала, полученного от свиноматок, ДНК *H. suis* была обнаружена в желудках всех 4 животных, при этом положительными были 2 пробы из СОЖ кардиального отдела, 4 пробы – фундального отдела и 1 проба – пилорического отдела (итого 7 положительных проб).

Результаты проведенных исследований на наличие или отсутствие патоморфологических изменений на СОЖ свиней сравнили с результатами обнаружения *H. suis* в микроскопических и биохимических тестах и выявления генома бактерии в ПЦР. Для этого биоматериал, полученный от каждой возрастной группы свиней, разделили на две группы: *H. suis*-положительные (*H. suis* «+») и *H. suis*-отрицательные (*H. suis* «-») в ПЦР. Данные макроскопической оценки состояния СОЖ

Таблица 1
Степень обсемененности образцов из пилорического отдела желудков свиней, установленная по наличию уреазной активности в CLO-тесте

Table 1
Contamination degree of samples from the pyloric region of pig stomachs determined by the urease activity in CLO-test

Возрастная группа животных	Количество исследованных желудков	Количество положительно прореагировавших проб в течение		
		1 ч	3 ч	24 ч
молочные поросята	5	0	0	0
откормочные свиньи	20	8	14	17
свиноматки	4	1	2	4

свиней, микроскопии и уреазного теста отнесли в соответствующие группы, результаты представлены в таблице 3.

Как видно из таблицы 3, в желудке одного молочного поросенка, в котором была выделена ДНК *H. suis*, в пилорическом отделе обнаружили умеренный гиперкератоз СОЖ, охватывающий менее 50% поверхности; микроскопическим и биохимическим методами соответствующих бактерий выявлено не было. В группе *H. suis*-отрицательных молочных поросят в одном случае был выявлен умеренный гиперкератоз СОЖ, однако ни одним из проведенных методов исследований обнаружить в пробе *H. suis* не удалось.

У откормочных свиней выраженный гиперкератоз и эрозии СОЖ наблюдали в группе *H. suis*-положительных животных, тогда как в группе *H. suis*-отрицательных выраженных воспалительных реакций выявлено не было. При микроскопии мазков-отпечатков СОЖ на фоне окрашенной слизи в 8 пробах из группы *H. suis*-положительных обнаружили граммотрицательные палочки с характерными для хеликобактерий формами, во всех случаях образцы были уреазо-положительными. В 2 из 3 желудков, макроскопические поражения которых были оценены на 4 балла, установили III степень обсеменения СОЖ фундального отдела *H. suis*, в одном желудке – II степень обсеменения.

При исследовании методом ПЦР слизистой желудка свиноматок ДНК *H. suis* была обнаружена во всех исследуемых образцах. При макроскопической оценке состояния СОЖ отмечали гиперкератоз кардиального,

Таблица 2
Обнаружение ДНК *H. suis* в образцах желудков свиней посредством ПЦР

Table 2
H. suis DNA detection in pig stomach samples by PCR

Группа животных (количество исследованных желудков)	Количество положительных проб, взятых со слизистой оболочки желудка			Всего положительных проб	Количество животных, в желудках которых обнаружена ДНК <i>H. suis</i>
	кардиального отдела	фундального отдела	пилорического отдела		
молочные (5)	0	0	1	1	1
откормочные (20)	4	17	15	36	17
свиноматки (4)	2	4	1	7	4

Таблица 3

Определение зависимости патоморфологических изменений СОЖ свиней от обнаружения *H. suis* в микроскопических и биохимических тестах и выявления его генома в ПЦР

Table 3

Determination of dependence between the pathomorphological changes in porcine gastric mucosa and *H. suis* detection in microscopic and biochemical tests and its genome detection in PCR

Группа животных (количество животных)	Макроскопическая оценка поражений СОЖ, баллы						Микроскопия +	CLO-тест +
	0	1	2	3	4	5		
Группа 1: <i>H. suis</i> «+» молочные поросята (1)	0	1	0	0	0	0	—	—
Группа 2: <i>H. suis</i> «—» молочные поросята (4)	3	1	0	0	0	0	—	—
Группа 1: <i>H. suis</i> «+» откормочные свиньи (17)	0	4	5	4	3	1	8	17
Группа 2: <i>H. suis</i> «—» откормочные свиньи (3)	1	1	1	0	0	0	12	0
Группа 1: <i>H. suis</i> «+» свиноматки (4)	0	0	1	2	1	0	2	4

фундального и пилорического отделов. В желудке, пораженном язвами в области пищеводного отверстия (нежелудистой его части), оцененными макроскопически на 4 балла, установили II степень обсеменения *H. suis* в кардиальном и фундальном отделах. Все образцы биоматериалов при постановке CLO-теста проагрировали положительно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные эпизоотологических исследований о распространении бактерии *H. suis* среди свиней, приведенные в различных публикациях, сильно различаются. Число выявленных случаев варьирует от 10,8 до 90,0%. Это можно объяснить тем, что, во-первых, язвенная болезнь имеет многофакторную этиологию; во-вторых, *H. suis* является сложным для выделения микроорганизмом, который до 2008 г. считали некультивируемым *in vitro*; в-третьих, материал для исследования отбирали от животных различного возраста; в-четвертых, образцы слизистой были получены из различных отделов желудка животных. Тем не менее большинство исследователей указывают на высокую (от 60% и более) распространенность *H. suis* среди свиней.

Проведенные исследования показали, что результаты макроскопической оценки поражений СОЖ в каждой возрастной группе свиней различались, самый высокий уровень поражений выявили в группе свиней на откорме. В группе *H. suis*-положительных (по данным ПЦР) откормочных свиней наблюдали в основном тяжелый гиперкератоз и эрозии СОЖ. По результатам микроскопических исследований и уреазного теста в биоматериале, взятом от этой возрастной группы животных, отмечали высокую степень обсеменности хеликобактериями. У всех откормочных свиней ДНК *H. suis* выделяли в фундальном отделе желудка. У молочных поросят патоморфологические изменения слизистой были незначительными или вообще отсутствовали, ДНК *H. suis* была выделена в одном из пяти исследованных желудков. Состояние СОЖ свиноматок характеризовалось умеренными поражениями, одна-

ко при проведении микроскопических исследований, биохимических тестов и ПЦР во всех образцах слизистой были обнаружены хеликобактерии.

У молочных поросят *H. suis* обнаружили в пилорическом отделе желудка, тогда как у откормочных свиней наиболее часто выявляли в фундальном отделе, а у свиноматок – в фундальном и кардиальном отделах. Это может указывать на сдвиг колонизации хеликобактериями СОЖ от пилорического к кардиальному отделу с увеличением возраста животного.

Полученные результаты исследований показывают, что *H. suis* может являться одним из факторов, играющих определенную роль в развитии патогенеза язвенной болезни желудка свиней.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 1–9, 11, 12, 14, 16, 17, 19 см. REFERENCES)

10. Голубкина Е. В., Левитан Б. Н., Умерова А. Р., Камнева Н. В. Некоторые эпидемиологические аспекты хеликобактериоза. *Астраханский медицинский журнал*. 2018; 13 (2): 6–16. DOI: 10.17021/2018.13.2.6.16.
13. Маев И. В., Кучерявый Ю. А., Андреев Д. Н., Баркалова Е. В. Эрадикационная терапия инфекции *Helicobacter pylori*: обзор мировых тенденций. *Терапевтический архив*. 2014; 86 (3): 94–99. eLIBRARY ID: 21568169.
15. Иванов А. В., Поздеев О. К., Валеева Ю. В. Хеликобактеры животных и их значение в патологии человека. *Ветеринарный врач*. 2010; 6: 17–21. eLIBRARY ID: 15522489.
18. Аруин Л. И., Исаков В. А. Оценка обсемененности слизистой оболочки желудка *Helicobacter pylori* и активности хронического гастрита. *Архив патологии*. 1995; 57 (3): 75–76. eLIBRARY ID: 30291067. PMID: 7677591.

REFERENCES

1. Baele M., Decostere A., Vandamme P., Ceelen L., Hellems A., Mast J., et al. Isolation and characterization of *Helicobacter suis* sp. nov. from pig stomachs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008; 58 (Pt 6): 1350–1358. DOI: 10.1099/ijs.0.65133-0.
2. Buck L. Y., Marutani V., Lorenzetti E., Alfieri A. A., Bracarense A. P. L. Ultrastructural and molecular characterization of non-*Helicobacter pylori* species in the gastric mucosa of naturally infected pigs. *Braz. J. Vet. Pathol.* 2018; 11 (2): 42–49. DOI: 10.24070/bjvp.1983-0246.v11i2p42-49.
3. De Bruyne E., Flahou B., Chiers K., Meyns T., Kumar S., Vermoote M., et al. An experimental *Helicobacter suis* infection causes gastritis and reduced daily weight gain in pigs. *Vet. Microbiol.* 2012; 160 (3–4): 449–454. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.06.031.

4. Queiroz D. M., Rocha G. A., Mendes E. N., Lage A. P., Carvalho A. C., Barbosa A. J. A spiral microorganism in the stomach of pigs. *Vet. Microbiol.* 1990; 24 (2): 199–204. DOI: 10.1016/0378-1135(90)90067-6.
5. Mendes E. N., Queiroz D. M., Rocha G. A., Nogueira A. M., Carvalho A. C., Lage A. P., Barbosa A. J. Histopathological study of porcine gastric mucosa with and without a spiral bacterium ("Gastrospirillum suis"). *J. Med. Microbiol.* 1991; 35 (6): 345–348. DOI: 10.1099/00222615-35-6-345.
6. Queiroz D. M., Rocha G. A., Mendes E. N., De Moura S. B., De Oliveira A. M., Miranda D. Association between *Helicobacter* and gastric ulcer disease of the pars esophagea in swine. *Gastroenterology.* 1996; 111 (1): 19–27. DOI: 10.1053/gast.1996.v111.pm8698198.
7. De Witte C., Ducatelle R., Haesebrouck F. The role of infectious agents in the development of porcine gastric ulceration. *Vet. J.* 2018; 236: 56–61. DOI: 10.1016/j.tvjl.2018.04.015.
8. Grasso G. M., Ripabelli G., Sammarco M. L., Ruberto A., Iannitto G. Prevalence of *Helicobacter*-like organisms in porcine gastric mucosa: a study of swine slaughtered in Italy. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1996; 19 (3): 213–217. DOI: 10.1016/0147-9571(96)00007-0.
9. Melnichouk S. I., Friendship R. M., Dewey C. E., Bildfell R. J., Smart N. L. *Helicobacter*-like organisms in the stomach of pigs with and without gastric ulceration. *Swine Health Prod.* 1999; 7 (5): 201–205. Available at: <https://www.aasv.org/shap/issues/v7n5/v7n5p201.html>.
10. Golubkina E. V., Levitan B. N., Umerova A. R., Kamneva N. V. Some epidemiological aspects of helicobacteriosis. *Astrakhan Medical Journal.* 2018; 13 (2): 6–16. DOI: 10.17021/2018.13.2.6.16 (in Russian)
11. Flahou B., Haesebrouck F., Pasmans F., D'Herde K., Driessen A., Van Deun K., et al. *Helicobacter suis* causes severe gastric pathology in mouse and Mongolian gerbil models of human gastric disease. *PLoS One.* 2010; 5 (11): e14083. DOI: 10.1371/journal.pone.0014083.
12. Augustin A. D., Savio A., Nevel A., Ellis R. J., Weller C., Taylor D., et al. *Helicobacter suis* is associated with mortality in Parkinson's disease. *Front. Med. (Lausanne).* 2019; 6:188. DOI: 10.3389/fmed.2019.00188.
13. Maev I. V., Kucheriavyy Iu. A., Andreev D. N., Barkalova E. V. Eradication therapy for *Helicobacter pylori* infection: review of world trends. *Terapevticheskii arkhiv.* 2014; 86 (3): 94–99. eLIBRARY ID: 21568169. (in Russian)
14. Hellemans A., Chiers K., De Bock M., Decostere A., Haesebrouck F., Ducatelle R., Maes D. Prevalence of '*Candidatus Helicobacter suis*' in pigs of different ages. *Vet. Rec.* 2007; 161 (6): 189–192. DOI: 10.1136/vr.161.6.189.
15. Ivanov A. V., Pozdeev O. K., Valeeva Yu. V. Animal *Helicobacters* and their importance in human pathology. *Veterinarnyy Vrach.* 2010; 6: 17–21. eLIBRARY ID: 15522489. (in Russian)
16. De Witte C., Taminiau B., Flahou B., Hautekiet V., Daube G., Ducatelle R., Haesebrouck F. In-feed bambermycin medication induces anti-inflammatory effects and prevents parietal cell loss without influencing *Helicobacter suis* colonization in the stomach of mice. *Vet. Res.* 2018; 49 (1):35. DOI: 10.1186/s13567-018-0530-1.
17. Hensing M. J., Geudeke M. J., Scheepens C. J., Tielen M. J., Schouten W. G., Wiepkema P. R. Slijmvliesveranderingen in de pars oesophagea bij varkens: prevalentie en de invloed van stress [Mucosal lesions in the pars esophagus in swine: prevalence and the effect of stress]. *Tijdschr. Diergeneesk.* 1992; 117 (15–16): 445–450. PMID: 1412355. (in German)
18. Aruin L. I., Isakov V. A. Evaluation of contamination of the gastric mucosa with *Helicobacter pylori* and activity of chronic gastritis [Otsenka obsemenennosti slizistoï obolochki zheludka *Helicobacter pylori* i aktivnosti khronicheskogo gastrita]. *Archive of Pathology [Arkhiv Patologii].* 1995; 57 (3): 75–6. eLIBRARY ID: 30291067. PMID: 7677591. (in Russian)
19. De Groote D., Van Doorn L. J., Ducatelle R., Verschuuren A., Haesebrouck F., Quint W. G., et al. '*Candidatus Helicobacter suis*', a gastric helicobacter from pigs, and its phylogenetic relatedness to other gastrospirilla. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999; 49 (Pt 4): 1769–1777. DOI: 10.1099/00207713-49-4-1769.

Поступила 17.08.2020

Принята в печать 05.10.2020

Received on 17.08.2020

Approved for publication on 05.10.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ / INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Нурғалиев Фарит Муллағалиевич, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ, г. Казань, Россия.

Farit M. Nurgaliev, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, FSBEI HE Kazan SAVM, Kazan, Russia.

Эффективность комплексного препарата на основе вторичных растительных ресурсов при микотоксикозе сельскохозяйственной птицы

Е. В. Кузьмина¹, Е. П. Долгов², М. П. Семенов³, П. В. Мирошниченко⁴

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии»,
г. Краснодар, Россия

¹ ORCID 0000-0003-4744-0823, e-mail: niva1430@mail.ru

² ORCID 0000-0003-2979-0782, e-mail: edolgov93@mail.ru

³ ORCID 0000-0001-8266-5900, e-mail: sever291@mail.ru

⁴ ORCID 0000-0002-5835-1159, e-mail: mpetrvas@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты изучения эффективности комплексного препарата на основе вторичных растительных ресурсов при микотоксикозе сельскохозяйственной птицы. Препарат фибралин содержит комплекс веществ полисахаридной (сухой свекловичный жом) и фосфолипидной (рапсовый лецитин) природы в соотношении 4:1. Исследования проведены на 18-суточных цыплятах-бройлерах кросса «Росс-308» со средней массой тела ($665,10 \pm 4,28$) г, в кормовых рационах которых были обнаружены микотоксины: Т-2 токсин, зеараленон и афлатоксин В₁. Концентрация токсинов по отдельности не превышала максимально допустимого уровня, но их сочетанное воздействие на организм птицы обуславливало развитие микотоксикоза. Применение фибралина в дозе 3 кг на тонну корма в течение 10 дней привело к снижению клинических признаков интоксикации, повышению сохранности поголовья на 13,5% и интенсивности приростов массы тела на 15,8%. Фармакологический эффект фибралина проявился улучшением морфобиохимических параметров крови птицы за счет снижения концентрации лейкоцитов на 19,3% и холестерина на 13,6% при увеличении содержания эритроцитов на 19,4%, гемоглобина – на 8,1% и кальция – на 9,5%. Антитоксическая терапия оказала положительное действие на структурное и функциональное состояние печени, что подтвердилось снижением уровня аминотрансфераз в сыворотке крови и нормализацией концентрации общего белка. Полученные данные могут служить основанием для применения данного биологического комплекса природного происхождения в качестве препарата с антитоксическими и гепатопротекторными свойствами и использования фибралина при терапии микотоксикозов у птицы.

Ключевые слова: микотоксикозы, птица, фибралин, свекловичный жом, лецитин.

Благодарность: Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-316-90029.

Для цитирования: Кузьмина Е. В., Долгов Е. П., Семенов М. П., Мирошниченко П. В. Эффективность комплексного препарата на основе вторичных растительных ресурсов при микотоксикозе сельскохозяйственной птицы. *Ветеринария сегодня*. 2020; 4 (35): 272–276. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-272-276.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Кузьмина Елена Васильевна, доктор ветеринарных наук, доцент, ведущий научный сотрудник отдела фармакологии Краснодарского НИВИ – обособленного структурного подразделения ФГБНУ «КНЦЗВ», 350004, Россия, г. Краснодар, ул. 1-я линия, д. 1, e-mail: niva1430@mail.ru.

UDC 619:616-002.8:636.5:615.9

Efficacy of a complex plant-based preparation for poultry mycotoxicosis

E. V. Kuzmina¹, E. P. Dolgov², M. P. Semenenko³, P. V. Miroshnichenko⁴

Federal State Budget Scientific Institution "Krasnodar Research Center for Animal Husbandry and Veterinary Medicine",
Krasnodar, Russia

¹ ORCID 0000-0003-4744-0823, e-mail: niva1430@mail.ru

² ORCID 0000-0003-2979-0782, e-mail: edolgov93@mail.ru

³ ORCID 0000-0001-8266-5900, e-mail: sever291@mail.ru

⁴ ORCID 0000-0002-5835-1159, e-mail: mpetrvas@mail.ru

SUMMARY

The article presents results of efficacy studies for a complex plant-based preparation for poultry mycotoxicosis. Feed additive fibrilin contains polysaccharides (dried sugar beet pulp) and phospholipids (rapeseed lecithin) in the proportion 4:1. Eighteen-day-old "Ross-308" broiler chickens with average weight of (665.10 ± 4.28) g were tested, since such mycotoxins as T-2 toxin, zearalenone and aflatoxin B₁ were detected in their feeds. Maximum admissible level of each toxin was not exceeded, however, their cumulative effect on poultry resulted in mycotoxicosis. Use of fibrilin in the feed (3 kg per one ton) for 10 days reduced clinical signs of intoxication, increased flock survival by 13.5% and stimulated body weight gain by 15.8%. Pharmacological effect of fibrilin was demonstrated by improvement of blood morphobiochemical parameters in poultry, i.e. reduction of leukocytes by 19.3% and cholesterol by 13.6%; and an increase in the number of erythrocytes by 19.4%, hemoglobin by 8.1% and calcium by 9.5%. Antitoxin therapy had a positive effect on liver structure and functions and that fact was confirmed by a decrease in aminotransferase level in serum and normal levels of total protein. The data obtained may justify the use of this natural bio-preparation as a product with antitoxic and hepatoprotective properties and the use of fibrilin for mycotoxicosis treatment of poultry.

Key words: mycotoxicoses, poultry, fibrilin, beet pulp, lecithin.

Acknowledgements: The research was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR) as part of Scientific Project No. 19-316-90029.

For citation: Kuzminova E. V., Dolgov E. P., Semenenko M. P., Miroshnichenko P. V. Efficacy of a complex plant-based preparation for poultry mycotoxicosis. *Veterinary Science Today*. 2020; 4 (35): 272–276. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-272-276.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Elena V. Kuzminova, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Leading Researcher, Department for Pharmacology, Krasnodar RVI – Detached Unit FSBI "KRCANVM", 350004, Russia, Krasnodar, 1 Liniya st., 1, e-mail: niva1430@mail.ru.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время наблюдается увеличение числа регистрируемых случаев микотоксикозов у животных, в том числе у сельскохозяйственной птицы, представляющих собой чрезвычайно высокую экологическую и экономическую опасность. Существуют сотни различных микотоксинов, которые различаются по химическому строению и влиянию на животных, к наиболее распространенным относятся афлатоксин, зеараленон, T-2 токсин, фумонизин и охратоксин. Многие микотоксины вызывают тяжелые необратимые изменения в организме животных, нередко заканчивающиеся летальным исходом. Значимость этой проблемы обостряется и тем, что микотоксины, попадая с кормами в организм животных, способны накапливаться в продуктах питания животного происхождения, что представляет большую опасность для здоровья человека [1, 2].

С учетом сказанного разработка эффективных антиоксидантных препаратов комплексного действия является актуальным направлением ветеринарной медицины. К средствам, обладающим антиоксидантными, гепатопротекторными и антиоксидантными свойствами, относится препарат на основе продуктов переработки растительного сырья, представленных пищевыми волокнами свекловичного жома и рапсовым лецитином, – фибралин.

Входящие в состав препарата пищевые волокна, получаемые из свекловичного жома, оказывают нормализующее влияние на моторную функцию желчевыводящих путей, стимулируя процессы выведения желчи и препятствуя развитию застойных явлений в гепатобилиарной системе. Свекла содержит много микроэлементов и витаминов, а свекловичный пектин, входящий в состав волокон, по своим физико-химическим свойствам (малая степень этерификации при большом числе свободных карбоксильных групп) является лучшим природным адсорбентом – комплексообразователем по отношению к различным ксенобиотикам [3–5].

Второй компонент фибралина – лецитин – представляет собой комплекс эссенциальных фосфолипидов и выполняет в организме разнообразные функции: входит в состав клеточных мембран (в виде фосфатидилхолина); является эмульгатором и регулятором кристаллизации холестерина; содержит омега-6 полиненасыщенные жирные кислоты, которые принимают участие в нормализации процессов транспорта липидов в кровотоке и способствуют лучшей всасываемости жиров из кишечника; играет важную роль в иммунной защите организма; проявляет антиоксидантное действие и др. [6–8].

Цель работы – изучить эффективность препарата фибралин при микотоксикозе цыплят-бройлеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препарат фибралин содержит комплекс веществ полисахаридной (сухой свекловичный жом) и фосфолипидной природы (рапсовый лецитин) в соотношении 4:1.

Изучение эффективности фибралина проводили в условиях частного хозяйства ИП Ремесник И. В. Динского района Краснодарского края на 440 цыплятах-бройлерах кросса «Росс-308» в возрасте 18 сут со средней массой тела $(665,10 \pm 4,28)$ г. До начала проведения опыта в хозяйстве в течение 5 дней отмечался падеж поголовья, который происходил в период перевода цыплят со стартового на ростовое кормление.

Методом иммуноферментного анализа провели исследование комбикорма вида «Рост» на наличие микотоксинов. Для этого использовали анализатор Stat Fax® 2600 (США) и тест-систему для непрямого твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа ЗАО «Фарматек» (Россия). Было установлено, что в комбикорме присутствуют микотоксины: T-2 токсин – 0,016 мг/кг; зеараленон – 0,018 мг/кг; афлатоксин B₁ – 0,002 мг/кг. Концентрация микотоксинов по отдельности не превышала максимально

Таблица 1
Динамика массы тела цыплят-бройлеров при лечении
микотоксикоза

Table 1
Body weight gain of broiler chickens treated for mycotoxicosis

Группы	Масса тела, г	
	1-й день опыта	10-й день опыта
опытная № 1	664,90 ± 4,26	1204,90 ± 11,3
опытная № 2	665,40 ± 4,41	1192,50 ± 12,9
контрольная № 3	664,80 ± 4,18	1040,70 ± 10,7

допустимого уровня (МДУ), но их сочетанное воздействие на организм птицы обуславливало развитие микотоксикоза.

Для оценки эффективности фибралина птиц разделили на 3 группы: опытная № 1 (200 голов) получала препарат в дозе 3 кг на тонну корма; опытная № 2 (200 голов) – препарат сравнения «АтоксБио Плюс» (ООО «ТекноФид», Россия) в дозе 1,5 кг на тонну корма; № 3 служила контролем (40 голов) и лечение не получала. Период применения препаратов составлял 10 дней.

В течение всего опыта за птицей вели клиническое наблюдение, в начале и в конце осуществляли взвешивание, павшие цыплята подвергались патолого-анатомическому вскрытию. На 1-й и 10-й дни опыта из каждой группы отбирали по 10 цыплят, у которых брали кровь для общего и биохимического анализов. Биохимические исследования проводили на автоматизированном анализаторе Vitalab Selectra Junior (Нидерланды) с использованием реактивов компаний ELITech Clinical System (Франция) и Analyticon Biotechnologies AG (Германия), комплексный гематологический анализ – на автоматизированном анализаторе Mythic 18 Vet (Швейцария).

Критериями эффективности лечения являлись: сохранность, клинический статус, аппетит, двигательная активность, результаты биохимического и общего анализа крови, а также прирост массы тела птицы.

Все эксперименты на животных проводили согласно требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 6.0. Критерий достоверности определяли по таблице Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что в опытной группе № 1, где применяли фибралин, за весь период проведения эксперимента отмечали гибель 3 цыплят (1,5%) в первые 2 дня опыта, в опытной группе № 2 пало 5 бройлеров (2,5%), а в контрольной группе зарегистрирована гибель 6 птиц (15%).

Гравиметрическими исследованиями выявлено, что во всех группах отмечен прирост массы тела, при этом у птицы контрольной группы (без лечения) интенсивность роста была заметно ниже, чем

в опытных группах. Так, на 10-й день исследований разница с опытной группой № 1 составила 15,8%, с группой № 2 – 14,6% (табл. 1).

При оценке гематологического статуса установлено, что в начале опыта у птиц всех групп содержание лейкоцитов регистрировалось близко к верхней границе нормы, в среднем $(37,10 \pm 1,27) \times 10^9/\text{л}$. К концу опыта в крови птиц из группы № 3 число лейкоцитов увеличилось на 9,1% и составило $(39,80 \pm 0,96) \times 10^9/\text{л}$, а в группах № 1 и 2 отмечалось снижение их концентрации на 19,3 и 16,2% соответственно. Кроме того, в группе птиц без терапии наблюдалось прогрессирующее снижение по отношению к первоначальному уровню эритроцитов на 12,1% – $(2,90 \pm 0,22) \times 10^{12}/\text{л}$ и гемоглобина на 6,7% – $(84,10 \pm 2,08)$ г/л. У цыплят-бройлеров в опытных группах № 1 и 2 отмечалась положительная динамика с увеличением по отношению к первоначальным данным: эритроцитов на 19,4 и 12,5%; гемоглобина на 8,1 и 11,6% соответственно.

Проведенные лабораторные исследования крови показали, что терапия микотоксикоза антитоксическими препаратами сопровождалась положительными изменениями в биохимическом профиле птицы с приоритетом по ряду показателей у цыплят опытной группы № 1 (табл. 2).

В уровне гепатоиндикаторных ферментов у птицы в начале опыта зафиксировано повышение аланин-аминотрансферазы (АлАТ) относительно референсных значений, при этом активность аспартатаминотрансферазы (АсАТ) регистрировалась на уровне верхней границы нормы, что свидетельствует о легкой степени развития цитолитического синдрома в печени, обусловленного воздействием данного сочетания микотоксинов и их концентрации. Антиоксическая терапия в опытных группах оказала положительное действие на структурное и функциональное состояние печени, что подтвердилось снижением уровня трансфераз в сыворотке крови птиц: в группе № 1 – АлАТ на 30,5% ($p \leq 0,01$) и АсАТ на 15,1%; в группе № 2 – АлАТ на 15,1% ($p \leq 0,05$) и АсАТ на 6,1%. В контрольной группе активность ферментов к 10-му дню исследований по отношению к первоначальным результатам увеличилась: АлАТ на 19,7% ($p \leq 0,05$) и АсАТ на 12,6% ($p \leq 0,05$). Эти изменения свидетельствуют о нарастании процесса цитолиза гепатоцитов при развитии микотоксикоза, приводящего к выходу ферментов в межклеточное пространство и повышению их уровня в крови.

О начальной степени поражения печени птицы при фоновых исследованиях свидетельствовала выявленная гиперхолестеринемия, которая отмечается при острой патологии печени в начале заболевания. Как известно, при переходе из острой в хроническую стадию концентрация холестерина падает ниже нормы. Эти изменения в холестериневом профиле были установлены и при проведении эксперимента: у цыплят-бройлеров на фоне поступления микотоксинов и при отсутствии лечения к концу опыта содержание холестерина регистрировалось за нижней границей нормы – $(2,46 \pm 0,09)$ ммоль/л при достоверной разнице от начальных данных в 33,7% ($p \leq 0,01$). Проведенное лечение способствовало оптимизации концентрации холестерина в группе № 1 на 13,6% и группе № 2 на 7,3% относительно фоновых данных.

Об улучшении протеинсинтетической функции печени у птицы опытных групп свидетельствовала

Таблица 2

Биохимические показатели крови цыплят-бройлеров при лечении микотоксикоза ($M \pm m; n = 10$)

Table 2

Blood chemistry values for broiler chickens treated for mycotoxicosis ($M \pm m; n = 10$)

Показатели	Группы		
	опытная № 1	опытная № 2	контрольная № 3
1-й день опыта			
АлАТ, Ед/л	22,60 ± 1,77	21,30 ± 1,67	23,90 ± 1,32
АсАТ, Ед/л	296,50 ± 5,60	284,50 ± 3,50	291,70 ± 4,40
Холестерин, ммоль/л	3,74 ± 0,18	3,69 ± 0,11	3,71 ± 0,12
Глюкоза, ммоль/л	8,70 ± 0,55	8,90 ± 0,46	9,10 ± 0,41
Креатинин, мкмоль/л	29,10 ± 1,32	28,50 ± 1,15	29,80 ± 0,79
Общий белок, г/л	31,20 ± 0,85	29,80 ± 1,22	30,40 ± 0,43
Кальций, ммоль/л	2,10 ± 0,12	2,10 ± 0,09	2,00 ± 0,05
Фосфор, ммоль/л	1,28 ± 0,16	1,34 ± 0,12	1,36 ± 0,18
10-й день опыта			
АлАТ, Ед/л	15,70 ± 0,39**	18,10 ± 0,48*	28,60 ± 0,54*
АсАТ, Ед/л	251,50 ± 5,60	267,30 ± 3,40	328,90 ± 4,70*
Холестерин, ммоль/л	3,23 ± 0,07*	3,42 ± 0,13	2,46 ± 0,09**
Глюкоза, ммоль/л	10,90 ± 0,63	9,40 ± 0,36	8,20 ± 0,27
Креатинин, мкмоль/л	32,30 ± 0,71	29,10 ± 0,62	26,80 ± 0,36
Общий белок, г/л	36,40 ± 0,43*	34,50 ± 1,30	28,60 ± 0,74
Кальций, ммоль/л	2,30 ± 0,06	2,20 ± 0,11	1,90 ± 0,13
Фосфор, ммоль/л	1,35 ± 0,15	1,39 ± 0,24	1,42 ± 0,17

* $p \leq 0,05$;** $p \leq 0,01$ – различия достоверны по отношению к фоновым данным (differences are verified in relation to background data).

нормализация концентрации общего белка, которая к 10-му дню исследований увеличилась по отношению к первоначальным результатам на 16,7% ($p \leq 0,05$) в группе № 1 и на 15,8% – в группе № 2. У цыплят контрольной группы гипопроteinемия к концу опыта стала более выраженной со снижением уровня общего белка на 5,9%.

Также в группе № 3 наблюдалось снижение концентрации креатинина на 10,1% по отношению к первоначальным результатам, а в опытных группах этот показатель существенно не изменился.

Фармакологическое влияние фибралина на протеиновый обмен обусловлено не только улучшением белоксинтезирующей функции печени под влиянием гепатопротекторного компонента препарата, но и поступлением в организм птицы белков свекловичного жома, представленных такими аминокислотами, как лизин, аргинин, лейцин, фенилаланин, треонин, валин, метионин и цистин.

Также именно с минеральным составом свекловичного жома, в котором много кальция, калия, натрия, магния, железа, марганца, меди и кобальта, связываем изменения в кальциево-фосфорном обмене у птицы при лече-

нии микотоксикоза. При фоновых исследованиях в крови цыплят уровень общего кальция регистрировался на нижней границе нормы – в среднем ($2,10 \pm 0,09$) ммоль/л. При применении фибралина к концу опыта у птицы опытной группы № 1 содержание кальция увеличилось до ($2,30 \pm 0,06$) ммоль/л, что соответствует параметрам нормы. В других группах значимых изменений в показателях минерального обмена не установлено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты проведенной работы показали, что комплексное использование веществ, обладающих адсорбционными, гепатопротекторными, антиоксидантными и обменностабилизирующими свойствами, позволяет улучшить сохранность и продуктивность птицы, выращенной на пораженных микотоксинами кормах. Применение фибралина при сочетанном микотоксикозе цыплят-бройлеров в дозе 3 кг на тонну корма приводит к снижению клинических признаков интоксикации, нормализации биохимической и морфологической картины крови, повышению сохранности поголовья и интенсивности прироста массы тела.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Папуниди К. Х., Трёмасов М. Я., Фисинин В. И., Никитин А. И., Семенов Э. И. Микотоксины (в пищевой цепи): монография. 2-е изд., перераб. и доп. Казань: ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»; 2017. 188 с. eLIBRARY ID: 32839807.
2. Мирошниченко П. В., Шантыз А. Х., Трошин А. Н., Тер-Аветисянц И. А., Панфилина Е. В., Хатхакумов С. С., Садикова Е. С. Диагностика и профилактика микотоксикозов животных и птиц в Краснодарском крае: методические рекомендации. Краснодар; 2016. 27 с. eLIBRARY ID: 26114776.
3. Корнен Н. Н., Викторова Е. П., Евдокимова О. В. Методологические подходы к созданию продуктов здорового питания. *Вопросы питания*. 2015; 84 (1): 95–99. eLIBRARY ID: 23142510.
4. Ипатова Л. Г., Кочеткова А. А., Нечаев А. П., Тарасова В. В., Филатова А. А. Пищевые волокна в продуктах питания. *Пищевая промышленность*. 2007; 5: 8–10. eLIBRARY ID: 9499391.
5. Семенихин С. О., Городецкий В. О., Лукьяненко М. В., Даишева Н. М. Современные исследования в области получения пищевых волокон из свекловичного жома. *Новые технологии*. 2020; 1 (51): 48–57. DOI: 10.24411/2072-0920-2020-10105.
6. Корнен Н. Н., Калманович С. А., Семененко М. П., Кузьмина Е. В. Сравнительная оценка эффективности антиоксидантного действия рапсовых и подсолнечных лецитинов в опытах на лабораторных животных. *Технология и товароведение инновационных пищевых продуктов*. 2017; 5 (46): 9–14. eLIBRARY ID: 30398142.
7. Огай М. А., Степанова Э. Ф., Малявина В. В. Использование лецитина в мягких лекарственных формах. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. 2011; 22-2 (117): 159–163. Режим доступа: https://www.bsu.edu.ru/upload/iblock/831/f22j117r%20vip%2016_2.pdf.
8. Лисовая Е. В., Тягушева А. А., Федосеева О. В., Викторова Е. П., Марченко А. А. Показатели качества и особенности состава лецитинов, полученных из растительных масел. *Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания*. 2019; 3 (29): 8–13. DOI: 10.24411/2311-6447-2019-10001.

REFERENCES

1. Papunidi K. Kh., Tremasov M. Ya., Fisinin V. I., Nikitin A. I., Semenov E. I. Mycotoxins (in food chain) [Mikotoksiny (v pishchevoj cepi)]: monograph. 2nd ed., revised and enlarged, Kazan: FSBSI "FCTRBS-ARRVI"; 2017. 188 p. eLIBRARY ID: 32839807. (in Russian)
2. Miroshnichenko P. V., Shantyz A. Kh., Troshin A. N., Ter-Avetis'yants I. A., Panfilina Ye. V., Khatkhakumova S. S., Sadikova Ye. S. Diagnosis and prevention of mycotoxicosis in animals and birds in the Krasnodarsky Krai [Dagnostika i profilaktika mikotoksikozov zhivotnyh i ptic v Krasnodarskom krae]: methodological recommendations. Krasnodar; 2016. 27 p. eLIBRARY ID: 26114776. (in Russian)
3. Kornen N. N., Viktorova E. P., Evdokimova O. V. Methodological approaches to the creation of healthy food. *Voprosy Pitaniia*. 2015; 84 (1): 95–99. eLIBRARY ID: 23142510. (in Russian)
4. Ipatova L. G., Kochetkova A. A., Nechaev A. P., Tarasova V. V., Filatova A. A. Food fibres in food stuffs. *Food Industry*. 2007; 5: 8–10. eLIBRARY ID: 9499391. (in Russian)
5. Semeniikhin S. O., Gorodetsky V. O., Lukjanenko M. V., Daisheva N. M. Contemporary studies in the field of dietary fibers isolation from sugar beet pulp. *New Technologies*. 2020; 1 (51): 48–57. DOI: 10.24411/2072-0920-2020-10105. (in Russian)
6. Kornen N. N., Kalmanovich S. A., Semenenko M. P., Kuzminova E. V. Comparative evaluation of efficacy of antioxidant action rapeseed and sunflower lecithins in experiments in laboratory animals. *Technology and the Study of Merchandise of Innovative Foodstuffs*. 2017; 5 (46): 9–14. eLIBRARY ID: 30398142. (in Russian)
7. Ogai M. A., Stepanova E. Ph., Maljavina V. V. Using lecithin in soft medical forms. *Belgorod State University Scientific Bulletin. Medicine. Pharmacy*. 2011; 22-2 (117): 159–163. Available at: https://www.bsu.edu.ru/upload/iblock/831/f22j117r%20vip%2016_2.pdf. (in Russian)
8. Lisovaya E. V., Tyagushcheva A. A., Fedoseeva O. V., Viktorova E. P., Marchenko L. A. Quality indicators and characteristics of the composition of lecithins obtained from vegetable oils. *Technologies for the Food and Processing Industry of AIC – Healthy Food*. 2019; 3 (29): 8–13. DOI: 10.24411/2311-6447-2019-10001. (in Russian)

Поступила 28.07.2020

Принята в печать 14.09.2020

Received on 28.07.2020

Approved for publication on 14.09.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Кузьмина Елена Васильевна, доктор ветеринарных наук, доцент, ведущий научный сотрудник отдела фармакологии Краснодарского НИВИ – обособленного структурного подразделения ФГБНУ «КНЦЗВ», г. Краснодар, Россия.

Долгов Евгений Петрович, аспирант ФГБНУ «КНЦЗВ», г. Краснодар, Россия.

Семененко Марина Петровна, доктор ветеринарных наук, доцент, заведующий отделом фармакологии Краснодарского НИВИ – обособленного структурного подразделения ФГБНУ «КНЦЗВ», г. Краснодар, Россия.

Мирошниченко Петр Васильевич, кандидат ветеринарных наук, заведующий отделом Краснодарского НИВИ – обособленного структурного подразделения ФГБНУ «КНЦЗВ», г. Краснодар, Россия.

Elena V. Kuzminova, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Leading Researcher, Department of Pharmacology, Krasnodar RVI – Detached Unit FSBSI "KRCACHVM", Krasnodar, Russia.

Evgeny P. Dolgov, Post-Graduate Student, FSBSI "KRCACHVM", Krasnodar, Russia.

Marina P. Semenenko, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Pharmacology, Krasnodar RVI – Detached Unit FSBSI "KRCACHVM", Krasnodar, Russia.

Petr V. Miroshnichenko, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Department, Krasnodar RVI – Detached Unit FSBSI "KRCACHVM", Krasnodar, Russia.

DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-277-282
УДК 636.5.087.7:637.5

Перспективы применения бетулина в бройлерном птицеводстве

М. В. Новикова¹, И. А. Лебедева², Л. И. Дроздова³, А. В. Бюлер⁴

ФГБНУ «Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр

Уральского отделения Российской академии наук» (ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН), г. Екатеринбург, Россия

¹ ORCID 0000-0003-1188-2240, e-mail: mvnovicova@mail.ru

² ORCID 0000-0002-2917-0391, e-mail: ialebedeva@yandex.ru

³ ORCID 0000-0001-9689-1781, e-mail: drozdova43@mail.ru

⁴ ORCID 0000-0002-5578-9921, e-mail: lavrov_aleksei@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Поиск и внедрение природоподобных технологий при выращивании цыплят-бройлеров и получении биологически полноценной и безопасной продукции птицеводства в условиях отказа от кормовых антибиотиков на сегодняшний день является актуальной задачей. При проведении профилактических и терапевтических ветеринарных мероприятий эффективным средством могут быть кормовые добавки на основе природных компонентов. В работе представлены результаты научного исследования по применению фитобиотика на основе бетулина в бройлерном птицеводстве. Испытания проведены в условиях технологического цикла на одной из птицефабрик Свердловской области на цыплятах-бройлерах кросса «Росс-308». Птице в опытной группе бетулин в сухом виде вводили в комбикорм с 21-го по 35-й день выращивания из расчета 2,5 мг/кг живой массы. Введение в рацион кормовой добавки на основе бетулина способствовало повышению прироста живой массы и выхода грудных мышц на 7,6% по отношению к контрольной группе. Установлено, что потребление цыплятами фитобиотика приводило к снижению отложения подкожного и абдоминального жира, повышало биологическую полноценность мяса за счет увеличения содержания зольных элементов, улучшало технологические свойства мяса за счет повышения влагоудерживающей способности мышечного волокна, а также за счет интенсивности формирования и созревания мышечного волокна. При проведении гистологических исследований образцов тканей поджелудочной железы цыплят-бройлеров выявлено увеличение площади островков Лангерганса, инсулин-продуцирующих клеточных комплексов. Под воздействием кормовой добавки на основе бетулина происходила активация работы поджелудочной железы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что применение бетулина в бройлерном производстве является перспективным направлением.

Ключевые слова: цыплята-бройлеры, кормовая добавка, бетулин, фитобиотик, живая масса, мышечное волокно, жир, поджелудочная железа, островки Лангерганса.

Благодарность: Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг. по направлению «Молекулярно-биологические и нанобиотехнологические методы создания биопрепаратов нового поколения, технологии и способы их применения с целью борьбы с особо опасными инфекционными, паразитарными и незаразными болезнями животных».

Для цитирования: Новикова М. В., Лебедева И. А., Дроздова Л. И., Бюлер А. В. Перспективы применения бетулина в бройлерном птицеводстве. *Ветеринария сегодня*. 2020; 4 (35): 277–282. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-277-282.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Новикова Мария Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела промышленного птицеводства ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, 624005, Россия, Свердловская область, Сысертский район, пос. Октябрьский, ул. Дружбы, д. 9, кв. 1, e-mail: mvnovicova@mail.ru.

UDC 636.5.087.7:637.5

Prospects of betulin application in broiler farming

M. V. Novikova¹, I. A. Lebedeva², L. I. Drozdova³, A. V. Byuler⁴

Federal State Budgetary Scientific Institution "Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences" (FSBSI UrFASRC UrB of RAS), Ekaterinburg, Russia

¹ ORCID 0000-0003-1188-2240, e-mail: mvnovicova@mail.ru

² ORCID 0000-0002-2917-0391, e-mail: ialebedeva@yandex.ru

³ ORCID 0000-0001-9689-1781, e-mail: drozdova43@mail.ru

⁴ ORCID 0000-0002-5578-9921, e-mail: lavrov_aleksei@mail.ru

SUMMARY

It is an urgent task today to seek and implement nature-like technologies in broiler production and obtain biologically complete and safe poultry products, thus refusing from antibiotic use in feed. Feed additives based on natural components can be an effective tool for implementation of preventive and therapeutic veterinary measures. The paper presents research study results of application of betulin-based phytobiotics in broiler farming. The tests were carried out on Ross-308 cross-breed broiler chickens within the production cycle at one of the poultry farms of the Sverdlovsk Oblast. Birds of the experimental group received compound feed supplemented with dry betulin at 2.5 mg/kg of live weight from day 21 to day 35 of growing. The introduction of betulin-based feed additive into the diet contributed to increase in live weight gain and 7.6% pectoralis muscle output as compared with the control group. It was established that the phytobiotic consumption resulted in reduced deposition of subcutaneous and abdominal fat, higher biological value of meat by increasing the ash content, improved technological properties of meat due to increasing water-holding capacity of muscle fiber and intensity of formation and maturation of muscle fiber. Histological studies of pancreatic tissue samples from broiler chickens showed increase in the mass of islets of Langerhans and insulin-producing cell complexes. The pancreas was activated due to effects of the betulin-based feed additive. The results obtained indicate that the use of betulin in broiler production is a promising trend.

Key words: broiler chicken, feed additive, betulin, phytobiotics, live weight, muscle fibre, fat, pancreas, islets of Langerhans.

Acknowledgements: This work was financially supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation within the Program of Fundamental Scientific Research of State Academies of Sciences for 2013–2020: Molecular biological and nanobiotechnological methods for development of new-generation biologicals, techniques and application for control of highly dangerous infectious, parasitic and non-contagious animal diseases.

For citation: Novikova M. V., Lebedeva I. A., Drozdova L. I., Byuler A. V. Prospects of betulin application in broiler farming. *Veterinary Science Today*. 2020; 4 (35): 277–282. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-277-282.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Maria V. Novikova, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Department for Commercial Poultry Breeding, FSBSI UrFASRC UrB of RAS, 624005, Russia, Sverdlovsk Oblast, Sysertsky District, Oktyabrskiy set., Druzhby st., 9, Apt. 1, e-mail: mvnovikova@mail.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Тенденция внедрения природоподобных технологий в бройлерное птицеводство продиктована требованиями Европейского союза и касается производства биологически полноценной и безопасной продукции. К 2025 г. российские птицеводческие предприятия при выращивании цыплят-бройлеров должны будут полностью отказаться от кормовых антибиотиков, поэтому поиск и внедрение в производство альтернативных биологических добавок на сегодняшний день представляются чрезвычайно актуальными [1, 2]. Использование фитобiotиков на основе природных компонентов при проведении профилактических и терапевтических ветеринарных мероприятий хорошо вписывается в технологический цикл и показывает выраженный биологический и экономический эффект [3–6]. Одной из перспективных современных разработок является фитобiotик на основе бетулина.

Получают бетулин из коры березы (лат. *Bétula*). Бетулин относится к группе тритерпеновых спиртов, обладает высокой физиологической активностью. Вещество обладает антисептическими, ранозаживляющими и противовоспалительными свойствами, противоязвенной, желчегонной и гепатопротекторной активностью. Его можно использовать при профилактике заболеваний печени, часто встречающихся у птицы мясного направления и связанных с алиментарными факторами [7]. Гиполипидемическая и гипохолестеринемическая активность бетулина эффективна при нормализации липидного обмена [8]. Он также обладает антибактериальной активностью в отношении ряда бактерий группы стрептококков [9, 10].

Бетулин давно применяется в медицине, а в ветеринарии и сельском хозяйстве его уникальные свойства

оценили недавно. В настоящее время наблюдается подъем интереса к этому фитобiotику со стороны ученых и практиков, рассматриваются возможности по его внедрению в технологический цикл, изучаются положительные аспекты влияния на организм птицы, причем не только зоотехнические, но физиологические и биохимические. Бетулин усиливает действие вакцин на организм цыплят, что экономически выгодно для птицеводческого предприятия [3, 9].

При применении бетулина у птиц улучшаются гликемические показатели. Вещество достоверно снижает концентрацию липидов в сыворотке крови, что проявляется в статистически значимом уменьшении концентрации общего холестерина и триглицеридов, а также сопровождается улучшением показателей функциональной активности печени (выраженное снижение активности аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы). Одновременно установлена антиоксидантная и противовоспалительная эффективность бетулина (показатели перекисного окисления липидов, активности каталазы, супероксиддисмутазы, концентрации противовоспалительных цитокинов). Показана нормализация соотношения иммунорегуляторных субпопуляций лимфоцитов (CD4+ и CB8+), снижение концентрации в крови воспалительных цитокинов (IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, TNF α , IFN γ). Благодаря антисептическим, ранозаживляющим и противовоспалительным свойствам бетулин можно применять для стерилизации ран и при воспалительных процессах желудочно-кишечного тракта (противоязвенная активность) [3, 8].

Цель данной работы – изучение влияния кормовой добавки на основе бетулина на технологические и биологические показатели при выращивании цыплят-бройлеров кросса «Росс-308».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Для проведения исследований в условиях производства по принципу аналогов было сформировано 2 группы петушков цыплят-бройлеров кросса «Росс-308», по 80 голов в каждой. Цыплятам опытной группы с 21-го по 35-й день выращивания в комбикорм вводили бетулин в сухом виде из расчета 2,5 мг/кг живой массы, вторая группа служила контролем.

Все эксперименты на животных проводили согласно требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

Гистологические исследования. В результате контрольного убоя цыплят-бройлеров по 5 голов из каждой группы, отобранных путем случайной выборки (в соответствии с рекомендациями Всероссийского научно-исследовательского и технологического института птицеводства, 2010), были взяты образцы тканей для гистологических исследований. Гистологические образцы грудных мышц и поджелудочной железы фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина. Изучение общей картины и структурных изменений проводили на парафиновых срезах, препараты окрашивали гематоксилином и эозином по общепринятой методике. Гистологические исследования документировались фотографированием на световом микроскопе Leica DM2500 с фотокамерой Leica.

Биохимические исследования крови проводились на автоматическом биохимическом анализаторе Chem Well 2910 Combi (Awavens Technology Inc., USA) с использованием стандартных наборов реактивов Vital Diagnostics SPb (Россия) и Diasys (Германия).

Цифровые данные обрабатывали при помощи стандартных статистических методов с применением компьютерных программ Microsoft Excel 2007 и Statistica 6.0. Достоверность рассчитана по критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гибрид кросс «Росс-308» выведен специалистами британской компании Aviagen и является результатом сложной схемы скрещивания пяти пород в четырех поколениях. Это быстрорастущий бройлер, имеющий эффективную кормоconversion и высокие мясные показатели. Индикатором положительного влияния на организм цыплят-бройлеров при введении в рацион различных добавок в период откорма является прирост живой массы. Причем важно учитывать, за счет чего произошел прирост – за счет мышц или жира отложения. Поэтому в начале и в конце опыта проводили взвешивание птицы, результаты представлены в таблице.

Анализ представленных в таблице данных указывает на незначительный прирост живой массы птиц опытной группы. Однако необходимо отметить, что в ходе анатомической разделки тушек было установлено, что у цыплят-бройлеров опытной группы на 36% меньше откладывалось подкожного и абдоминального жира на внутренних органах и брыжейке кишечника, выход грудных и ножных мышц был выше на 7,6% по отношению к контрольной группе. Это подтверждает гипотетические свойства бетулина.

Показатели сохранности поголовья в обеих группах были на уровне 100%. Однородность стада показывала равномерность набора живой массы цыплятами

Таблица

Технологические показатели выращивания цыплят-бройлеров до и после опыта (n = 160)

Table
Broiler chicken growth parameters
before and after the experiment (n = 160)

Показатель	Контрольная группа	Опытная группа
Живая масса на 21-й день, г	520,00 ± 18,56	522,80 ± 26,31
Живая масса на 35-й день, г	1924,80 ± 44,93	1942,80 ± 57,70
Прирост живой массы, г	1404,80	1420,00
Однородность, %	85	90
Сохранность, %	100	100

в период выращивания, в опытной группе она была на 5% выше по отношению к контролю, что указывает на положительное влияние бетулина на рост и развитие бройлеров.

Для более детального изучения состояния мышечного волокна были проведены гистологические исследования. Установлена зависимость количества и качества мяса от размеров мышечных волокон. Бóльшее число мышечных волокон указывает на бóльшее количество и лучшее качество мяса, низкое содержание жира. С увеличением массы отдельных мышц уменьшается толщина мышечных волокон вследствие появления новых, более тонких. Структура мышечной ткани и интерстициальной соединительной ткани цыплят опытных групп (рис. 1 и 4), в отличие от контрольной, была представлена компактной, с почти полностью завершенным процессом созревания, мышечной тканью, оформленной мелкокапельным жиром, расположенным периваскулярно. Внутри мышцы появляются более крупные кровеносные сосуды, что способствует лучшему питанию тканей.

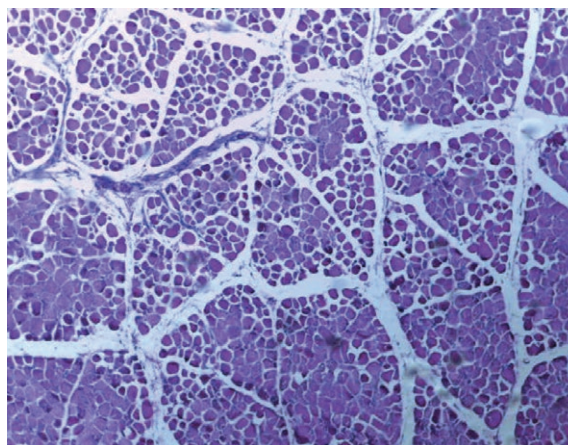


Рис. 1. Структура пучков мышечных волокон бедренной группы мышц птиц опытной группы. Окраска гематоксилином и эозином (увеличение ×100)

Fig. 1. The structure of femoral muscle fiber bundles in birds of the experimental group. Hematoxylin and eosin staining (100× magnification)

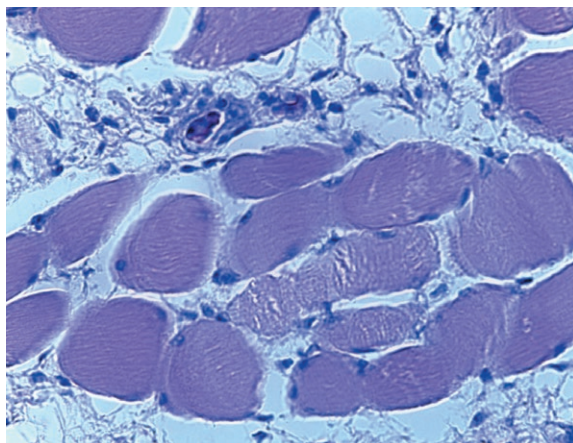


Рис. 2. Незрелые мышечные волокна в пучке (контрольная группа). Окраска гематоксилином и эозином (увеличение $\times 400$)

Fig. 2. Immature muscle fibers in the bundle (control group). Hematoxylin and eosin staining (400 $\times$ magnification)

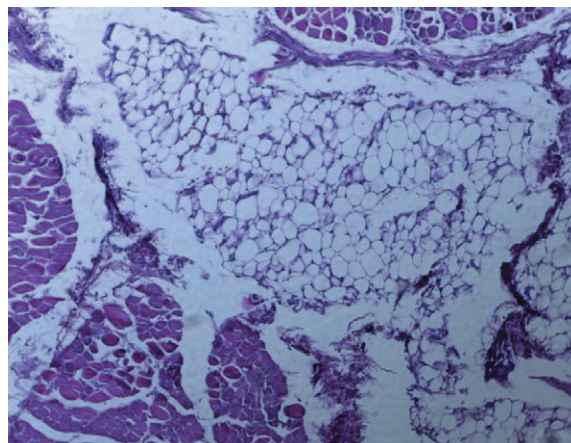


Рис. 3. Пучки мышечных волокон с прослойкой жировых клеток (контрольная группа). Окраска гематоксилином и эозином (увеличение $\times 200$)

Fig. 3. Muscle fiber bundles with a fat cell layer (control group). Hematoxylin and eosin staining (200 $\times$ magnification)

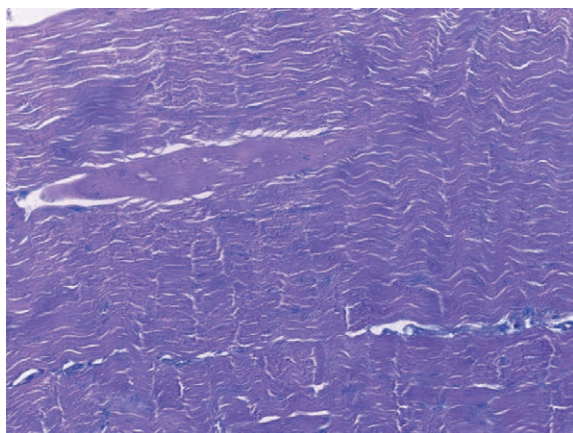


Рис. 4. Грудная мышца цыплят опытной группы. Поперечнополосатая исчерченность четко выражена, что свидетельствует о созревании данного мышечного волокна. Окраска гематоксилином и эозином (увеличение $\times 200$)

Fig. 4. The breast muscle of the birds in the experimental group. The striated pattern is clearly expressed indicating the maturity of this muscle fiber. Hematoxylin and eosin staining (200 $\times$ magnification)

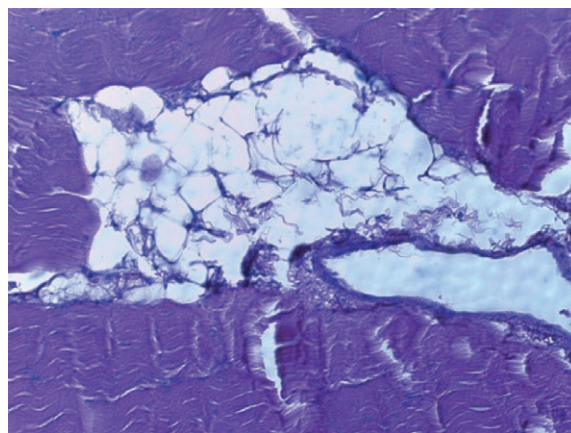


Рис. 5. Периваскулярное отложение крупных капель жира в мышцах контрольных бройлеров. Окраска гематоксилином и эозином (увеличение $\times 200$)

Fig. 5. Perivascular deposition of large fat droplets in the muscles of control broilers. Hematoxylin and eosin staining (200 $\times$ magnification)

В образцах, полученных от птиц контрольной группы, процесс формирования и созревания мышечной ткани как в грудной, так и в бедренной группе мышц имел тенденцию незавершенного созревания (рис. 2) с крупнокапельным ожирением соединительной ткани. Жировая клетчатка, которая располагается вдоль промежуточной соединительной ткани, содержит значительное количество жира. Адипоциты более крупные, местами располагаются плотно друг к другу, образуя сплошную прослойку. Жировые прослойки с соединительной тканью иногда проникают между мелкими мышечными пучками (рис. 3 и 5).

Необходимо отметить, что введение в рацион фитобиотиков на основе бетулина способствовало формированию более зрелого мышечного волокна. Такое

мясо наиболее безопасно для человека и обладает хорошими диетическими свойствами.

Бетулин положительно повлиял на влагоудерживающую способность мышечных волокон грудных мышц, являющуюся важным технологическим показателем при охлаждении, замораживании или хранении, при изготовлении колбасных изделий и копченостей из мяса бройлеров. Потери мясного сока при тепловой обработке приводят к обезвоживанию тканей, понижению сочности, ухудшению консистенции, структуры и вкуса получаемой продукции. Исследования показали, что бетулин повышал влагоудерживающую способность грудных мышц цыплят-бройлеров на 5,1% по отношению к показателям контрольной группы.

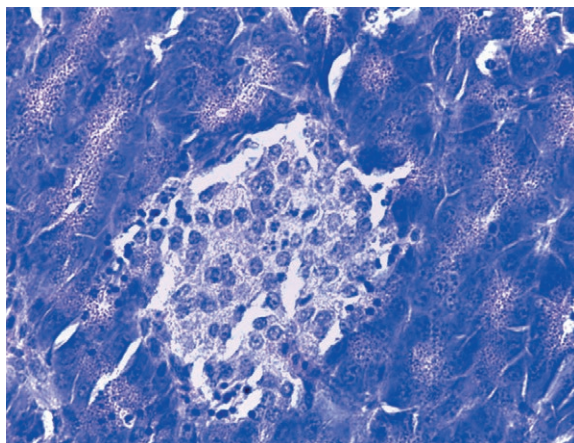


Рис. 6. Поджелудочная железа цыплят контрольной группы. Островки Лангерганса четко очерчены, бета-клетки в состоянии активной секреции. Окраска гематоксилином и эозином (увеличение $\times 400$)

Fig. 6. Pancreas of chickens in the control group. The islets of Langerhans are clearly defined, beta cells are in active secretion. Hematoxylin and eosin staining (400 $\times$ magnification)

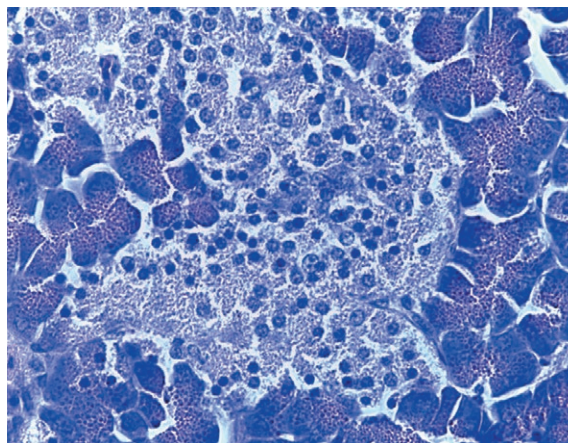


Рис. 7. Поджелудочная железа цыплят опытной группы. Островки Лангерганса резко увеличены в размерах. Окраска гематоксилином и эозином (увеличение $\times 400$)

Fig. 7. Pancreas of chickens in the experimental group. The size of the islets of Langerhans has sharply increased. Hematoxylin and eosin staining (400 $\times$ magnification)

Дополнительные исследования химического состава мышечной ткани выявили увеличение накопления зольных элементов в мышечном волокне цыплят опытной группы на 41,9% (контрольная группа – $1,08 \pm 0,16$, опытная – $1,86 \pm 0,25$), что также указывает на увеличение биологической полноценности мяса цыплят-бройлеров при использовании бетулина.

При проведении биохимического анализа крови выявили достоверные изменения концентрации мочевой кислоты в контрольной ($450,07 \pm 35,97$ мкмоль/л) и опытной ($230,17 \pm 26,78$ мкмоль/л) группах (при $p \leq 0,01$). Это связано с блокированием распада пуриновых оснований в организме бройлеров. В организме цыплят опытной группы процессы синтеза белка и формирование мышечного волокна протекали более интенсивно.

Установлено, что бетулин оказывал влияние на развитие и состояние внутренних органов. Гистологические исследования поджелудочной железы цыплят-бройлеров контрольной группы показали, что островки Лангерганса четко очерчены, бета-клетки в состоянии активной секреции (рис. 6).

У цыплят-бройлеров опытной группы, которые получали кормовую добавку на основе бетулина, поджелудочная железа секретировала нормально, но островки Лангерганса резко увеличивались в объеме (рис. 7). Было зафиксировано активное инсулинообразование. Так, в поджелудочной железе цыплят-бройлеров выявлено увеличение площади островков Лангерганса, инсулин-продуцирующих клеточных комплексов. Под воздействием бетулина происходит активация работы поджелудочной железы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований было установлено, что кормовая добавка на основе бетулина приводила к снижению отложения подкожного и абдоминального жира при незначительной разнице по живой массе цыплят-бройлеров; повышала биологическую полноценность мяса за счет увеличения

содержания зольных элементов; улучшала технологические свойства мяса за счет повышения влагосодерживающей способности мышечного волокна; способствовала накоплению в мясе протеинов и минеральных веществ и интенсивности формирования и созревания мышечного волокна. В поджелудочной железе птиц было зафиксировано увеличение площади островков Лангерганса, инсулин-продуцирующих клеточных комплексов, происходила активация работы поджелудочной железы.

Кормовая добавка на основе бетулина отлично вписывается в технологию выращивания цыплят-бройлеров и является одним из перспективных направлений внедрения природоподобных технологий в птицеводство.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 3–10 см. REFERENCES)

1. Бюлер А. В., Лебедева И. А., Новикова М. В., Игнатьев В. Э. Влияние адаптогенной кормовой добавки на основе эмульгированного бетулина на структуру и химический состав печени цыплят-бройлеров. В кн.: *Современные тенденции научного обеспечения в развитии АПК: фундаментальные и прикладные исследования: материалы Научно-практической (очно-заочной) конференции с международным участием*. Омск; 2017: 116–119. eLIBRARY ID: 30530530.
2. Задорожная М. В., Лыско С. Б., Красиков А. П. Эффективность применения бетулина в птицеводстве. *Ветеринарный врач*. 2012; 5: 34–36. eLIBRARY ID: 18235683.

REFERENCES

1. Buhler A. V., Lebedeva I. A., Novikova M. V., Ignatyev V. E. Effects of emulsified betulin-based adaptogenic feed additive on the structure and chemical composition of broiler chicken liver [Vliyaniye adaptogennoy kormovoy dobavki na osnove emul'girovannogo betulina na strukturu i himicheskij sostav pecheni cyplat-brojlerov]. In: *Modern trends of scientific support in the agro-industrial complex development: fundamental and applied research [Sovremennye tendencii nauchnogo obespecheniya v razvitiy APK: fundamental'nye i prikladnye issledovaniya]: materials of a Scientific-practical (in-praesentia/in-absentia) Conference with International Participation*. Omsk; 2017: 116–119. eLIBRARY ID: 30530530. (in Russian)
2. Zadorozhnaya M. V., Lysko S. B., Krasikov A. P. Effectiveness of betulin in poultry. *Veterinarnyj vrach*. 2012; 5: 34–36. eLIBRARY ID: 18235683. (in Russian)

3. Lebedeva I. A., Buhler A. V., Novikova M. V. Stimulation of follicle maturation in the parent flock of hens. *Reprod. Domest. Anim.* 2019; 54 (S3): 116. eLIBRARY ID: 39566304.

4. Li X. D., Zhang Y. J., Han J. C. Betulin inhibits lung carcinoma proliferation through activation of AMPK signaling. *Tumor Biol.* 2014; 35 (11): 11153–11158. DOI: 10.1007/s13277-014-2426-7.

5. Mikova N. M., Chesnokov N. V., Mazurova E. V., Pavlenko N. I., Ivanchenko N. M. Thermal transformation of betulin by alkaline activation. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* 2016; 42 (7): 741–747. DOI: 10.1134/S1068162016070104.

6. Myz S. A., Shakhtshneider T. P., Mikhailenko M. A., Ogienko A. G., Bogdanova E. G., Ogienko A. A., et al. Ultrafine betulin formulation with biocompatible carriers exhibiting improved dissolution rate. *Natural Product Communications.* 2015; 10 (8): 1345–1347. DOI: 10.1177/1934578x1501000806.

7. Novikova M., Lebedeva I. Improvement of reproductive potential of chicken hens from parent broiler flock by means of the use of supplements based on triterpene spirits. *Reprod. Domest. Anim.* 2018; 53 (S2): 174. eLIBRARY ID: 35607552.

8. Pokorny J., Horka V., Sidova V., Urban M. Synthesis and characterization of new conjugates of betulin diacetate and bis (triphenylsilyl) betulin with substituted triazoles. *Monatsh. Chem.* 2018; 149: 839–845. DOI: 10.1007/s00706-017-2113-7.

9. Pozharitskaya O. N., Karlina M. V., Shikov A. N., Kosman V. M., Makarov V. G., Casals E., Rosenholm J. M. Pharmacokinetics and tissue disposition of nano-system-entrapped betulin after endotracheal administration to rats. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 2017; 42: 327–332. DOI: 10.1007/s13318-016-0340-7.

10. Shakhtshneider T. P., Mikhailenko M. A., Drebuschak V. A., Drebuschak T. N., Malyar Yu. N., Kuznetsova S. A. Effect of ball-milling on preparation of composites of betulin and betulin diacetate with polyethylene glycol. In: *Fundamental Bases of Mechanochemical Technologies: The Book of Abstracts of the V International Conference.* Novosibirsk; 2018: 153. eLIBRARY ID: 36711414.

Поступила 03.08.2020

Принята в печать 08.09.2020

Received on 03.08.2020

Approved for publication on 08.09.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Новикова Мария Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела промышленного птицеводства ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия.

Лебедева Ирина Анатольевна, доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник отдела промышленного птицеводства, ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия.

Дроздова Людмила Ивановна, доктор ветеринарных наук, профессор, старший научный сотрудник ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия.

Бюлер Алексей Владимирович, кандидат химических наук, старший научный сотрудник отдела промышленного птицеводства ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия.

Maria V. Novikova, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Department for Commercial Poultry Breeding, FSBSI UrFASRC UrB of RAS, Ekaterinburg, Russia.

Irina A. Lebedeva, Doctor of Science (Biology), Associate Professor, Leading Researcher, Department for Commercial Poultry Breeding, FSBSI UrFASRC UrB of RAS, Ekaterinburg, Russia.

Lyudmila I. Drozdova, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Senior Researcher, FSBSI UrFASRC UrB of RAS, Ekaterinburg, Russia.

Alexey V. Byuler, Candidate of Science (Chemistry), Senior Researcher, Department for Commercial Poultry Breeding, FSBSI UrFASRC UrB of RAS, Ekaterinburg, Russia.

Парвовирусный энтерит собак: анализ эпизоотической ситуации и перспективы

Т. С. Галкина¹, А. К. Караулов²

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ ORCID 0000-0001-9494-8537, e-mail: galkina_ts@arriah.ru

² ORCID 0000-0002-5731-5762, e-mail: karaulov@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Парвовирусный энтерит является одним из опасных заболеваний собак и вызывает определенную обеспокоенность у практикующих врачей и владельцев собак по всему миру. Парвовирус 2-го типа (CPV-2) может поражать собак в любом возрасте, но наиболее подвержены риску заражения щенки в возрасте от 6 недель до 6 месяцев. Одним из основных биологических свойств парвовируса является его непрерывная генетическая эволюция, которая привела к тому, что исходный тип вируса был заменен новыми антигенными вариантами – CPV-2a, CPV-2b и CPV-2c. Согласно литературным данным, в настоящее время все три варианта вируса циркулируют в популяции домашних собак по всему миру. В работе представлен анализ эпизоотической ситуации и сезонности заболеваемости собак парвовирусным энтеритом в 2017–2019 гг. в отдельных округах Российской Федерации. Показано, что среди регистрируемых инфекционных болезней собак парвовирусный энтерит находится на первом месте, его доля за исследуемый период составила 37%. Установлено, что заболевание фиксируется круглогодично, но частота случаев зависит от сезона. Заражение собак парвовирусом в основном происходит весной, поздней осенью и ранней зимой, что, вероятно, связано с перепадами суточной температуры в эти периоды и снижением резистентности организма животных. Несмотря на обширную вакцинацию, основной причиной широкого распространения вируса является либо вмешательство материнских антител у вакцинированных щенков, либо низкая эффективность иммунной защиты у взрослых собак. Сделан вывод о необходимости проведения мониторинга циркуляции и распространения парвовируса с целью изучения генетических и антигенных свойств вновь выявляемых изолятов для своевременного обновления вакцинных штаммов, используемых при создании средств специфической профилактики.

Ключевые слова: парвовирус (CPV), парвовирусный энтерит собак, болезни собак, эпизоотическая ситуация.

Для цитирования: Галкина Т. С., Караулов А. К. Парвовирусный энтерит собак: анализ эпизоотической ситуации и перспективы. *Ветеринария сегодня*. 2020; 4 (35): 283–289. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-283-289.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Галкина Татьяна Сергеевна, кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией профилактики болезней мелких домашних животных ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьево, e-mail: galkina_ts@arriah.ru.

UDC 619:616.98:578.822.2:636.7:616-036.22

Canine parvovirus enteritis: epidemic situation analysis and perspectives

T. S. Galkina¹, A. K. Karaulov²

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ ORCID 0000-0001-9494-8537, e-mail: galkina_ts@arriah.ru

² ORCID 0000-0002-5731-5762, e-mail: karaulov@arriah.ru

SUMMARY

Parvovirus enteritis is one of canine dangerous diseases which poses a particular concern for practitioners and dog owners around the world. Parvovirus type 2 (CPV-2) can affect dogs at any age, but puppies between 6 weeks and 6 months old are most susceptible to infection. One of the main biological properties of parvovirus is its continuous genetic evolution, which led to the replacement of the original virus type by new antigenic variants – CPV-2a, CPV-2b and CPV-2c. According to the literature data, all three variants of the virus are currently circulating in the domestic dog population worldwide. The paper presents analysis of the epidemic situation and seasonal occurrence of canine parvovirus enteritis in certain regions of the Russian Federation in 2017–2019. It was shown that parvovirus enteritis was ranked first among the registered infectious diseases of dogs and accounted for 37% during the study period. It has been established that the disease is registered all year round, but the frequency of disease cases depends on the season. Canine parvovirus infection mainly occurs in spring, late autumn and early winter, which is probably associated with changes in daily temperature during these periods and decreased animal resistance. Despite extensive vaccination, the main reason for the wide spread of the virus is either interference with maternal antibodies in vaccinated puppies or low level of immune protection in adult dogs.

It has been concluded that it is necessary to monitor the parvovirus circulation and spread in order to study the genetic and antigenic properties of newly identified isolates for the timely update of vaccine strains used for development of specific means of prevention.

Key words: parvovirus (CPV), canine parvovirus enteritis, canine diseases, epidemic situation.

For citation: Galkina T. S., Karaulov A. K. Canine parvovirus enteritis: epidemic situation analysis and perspectives. *Veterinary Science Today*. 2020; 4 (35): 283–289. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-283-289.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Tatyana S. Galkina, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Laboratory for Prevention of Small Pet Diseases, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: galkina_ts@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Возбудителем парвовирусного энтерита собак является парвовирус 2-го типа (Canine parvovirus type 2, CPV-2), являющийся представителем рода *Protoparvovirus*, семейства *Parvoviridae*. Это один из наиболее опасных кишечных патогенов у собак. CPV-2 близкородственен вирусу панлейкопении кошек и вирусу энтерита норок. Существует также парвовирус собак 1-го типа (CPV-1, или MVC – minute virus of canines), впервые выделенный из фекалий собак в 1967 г., значительно отличающийся по своим молекулярно-биологическим и антигенным свойствам от CPV-2 и не играющий значительной роли в инфекционной патологии собак. Парвовирус собак 2-го типа был выявлен в конце 1970-х гг., он вызывал серьезные вспышки инфекции в питомниках и приютах для собак во всем мире. Данный вирус, как и все парвовирусы, реплицируется в быстро делящихся клетках и очень устойчив к условиям внешней среды: может сохраняться более полугода в фекалиях, на загрязненных предметах ухода, подстилке. Вирус устойчив к воздействию жирорастворителей, например эфиру и хлороформу, однако многие детергенты и дезинфектанты (гипохлорит натрия и др.) инактивируют его [1].

Вскоре после первого появления CPV-2 претерпел генетическую эволюцию, породив последовательно два антигенных варианта (CPV-2a и CPV-2b), которые постепенно заменили первоначальный тип. В конце 90-х гг. в Европе и Америке был обнаружен новый антигенный вариант вируса CPV-2с. В 1996 г. был опи-

сан ряд дополнительных мутаций, некоторые из них привели к антигенным изменениям в вирусе. Проведенные в Италии исследования штаммов CPV-2 выявили появление мутанта вируса с аминокислотной заменой в положении Glu-426 в капсидном белке VP2. Тип CPV-2с быстро распространился в другие страны и в настоящее время циркулирует совместно с CPV-2a и CPV-2b. С момента выявления CPV-2с был также обнаружен в Азии, Европе, Северной и Южной Америке, а также в Африке. Для прикрепления к клетке парвовирус собак использует клеточный трансферриновый рецептор (TfR), мутации в гене, кодирующем капсидный белок VP2, способствуют расширению спектра потенциальных хозяев вируса. Так, исходные штаммы CPV-2 вызывают кишечную инфекцию только у собак, в отличие от изолятов CPV-2a/2b, которые в экспериментальных и естественных условиях могут инфицировать представителей семейства кошачьих, а варианты CPV-2с, первоначально выделенные от леопардов, поражают собак и кошек. При экспериментальном заражении хорьков, норок и кошек было установлено, что клинические признаки парвовирусного энтерита выражены слабо [2–4]. Несмотря на антигенные различия в белке VP2, все сероварианты парвовируса дают перекрестные реакции при исследованиях в реакциях гемагглютинации и нейтрализации с поликлональными сыворотками [1, 5]. Парвовирус собак претерпевает непрерывную эволюцию, и новые генетические варианты вируса, отличающиеся по антигенным характеристикам, могут влиять на восприимчивость молодых животных к инфекции в период, когда уровень защитных материнских антител у них снижается до минимальных значений. Эта изменчивость генома вируса может негативно влиять на эффективность вакцинации, хотя недавно было показано, что собаки, иммунизированные однократно живой аттенуированной вакциной на основе исходного штамма CPV-2, были защищены от заражения полевым изолятом вируса типа 2с [2, 3].

Парвовирусный энтерит является высококонтагиозным вирусным заболеванием собак, характеризующимся рвотой, геморрагическим гастроэнтеритом, диареей, миокардитом, лейкопенией, дегидратацией, и может вызывать гибель животных. Заболевание протекает, как правило, остро, животные могут погибнуть через 2–3 дня после проявления первых клинических признаков. Инкубационный период при естественном заражении длится до 10 дней и зависит от резистентности организма и количества вирусных частиц, попавших в желудочно-кишечный тракт животного [1, 5, 6].

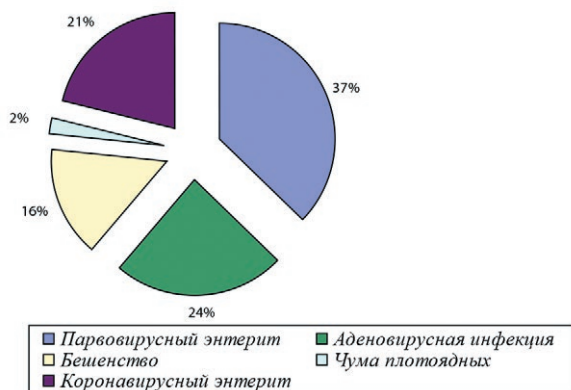


Рис. 1. Заболеваемость собак инфекционными болезнями в Российской Федерации в 2017–2019 гг.

Fig. 1. Morbidity rates for canine infectious diseases in the Russian Federation in 2017–2019

Парвовирус может поражать собак в любом возрасте, но тяжелее всего заболевание протекает у щенков от 6 недель до 6 месяцев. Этому заболеванию подвержены все собаки, хотя считается, что животные смешанных пород менее восприимчивы к инфекции, чем чистокровные. В группе риска заражения парвовирусом собаки таких пород, как ротвейлеры, доберманы-пинчеры, английские спрингер-спаниели, американские питбульерьеры и немецкие овчарки [1, 7, 8].

Инфицирование CPV-2 происходит алиментарным путем через слизистую ротовой полости при контакте с фекалиями зараженных собак или загрязненной поверхностью. При попадании в организм вирус поражает в основном лимфоидные ткани, кишечный эпителий и костный мозг [7]. У новорожденных щенков вирус вызывает тяжелый миокардит, клинические признаки которого проявляются через несколько недель после заражения. Парвовирусная инфекция у собак характеризуется также снижением количества лейкоцитов в результате инфицирования костного мозга и лимфоидных тканей. После вакцинации или заражения полевыми штаммами вируса почти все взрослые собаки в течение жизни обладают напряженным иммунитетом к агенту. У взрослых инфицированных животных заболевание принимает абортиную, бессимптомную персистентную и легкую клиническую форму. Летальность от парвовирусного энтерита колеблется в пределах 30–50%, но в отдельных случаях может достигать 100% [3, 4, 8, 9].

Основным методом борьбы с этим заболеванием в популяции домашних животных является вакцинация. В 1979 г. были разработаны инактивированные и модифицированные живые вирусные вакцины, которые стали первыми препаратами против CPV-2. Вакцины

обеспечивают защитный иммунитет, позволяющий контролировать парвовирусную инфекцию у собак. Тем не менее вирус по-прежнему широко распространен в природе и циркулирует во всем мире. Его генетическая эволюция и появление новых антигенных вариантов CPV-2a, CPV-2b и CPV-2c представляют интерес и обуславливают актуальность исследований многих ученых разных стран. В связи с этим необходим постоянный эпизоотологический надзор с целью выявления новых вариантов CPV-2, который поможет оценить необходимость обновления доступных в настоящее время вакцин против парвовирусного энтерита собак.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали официальные данные ФГБУ «Центр ветеринарии» МСХ РФ по заболеваемости собак парвовирусным энтеритом в отдельных субъектах Российской Федерации за 2017–2019 гг. Анализ эпизоотической ситуации проводили ретроспективно, полученные данные выражали графически и картографически. В работе использовались данные по распространенности CPV-2 в мире, размещенные в библиографических и реферативных базах данных PubMed, Web of Science, Scopus.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Неблагополучие по вирусным болезням собак на территории отдельных округов Российской Федерации отражено на рисунке 1. Показано, что в 2017–2019 гг. чаще всего регистрировали парвовирусный энтерит (37%), доля заболеваемости аденовирусной инфекцией составила 24%, коронавирусным энтеритом – 21%, бешенством – 16%, чумой плотоядных – 2% и инфекционным гепатитом – меньше 1%.



Рис. 2. Распространенность парвовирусного энтерита в субъектах РФ в 2017 г.

Fig. 2. Distribution of parvovirus enteritis in RF Subjects in 2017



Рис. 3. Распространенность парвовирусного энтерита в субъектах РФ в 2018 г.

Fig. 3. Distribution of parvovirus enteritis in RF Subjects in 2018



Рис. 4. Распространенность парвовирусного энтерита в субъектах РФ в 2019 г.

Fig. 4. Distribution of parvovirus enteritis in RF Subjects in 2019

Анализируя данные, полученные за три года, можно отметить, что парвовирусный энтерит регистрируется среди собак ежегодно в различных субъектах страны (рис. 2–4).

Программа базовой комплексной вакцинации собак предполагает формирование иммунитета к парвовирусу, а также снижение смертности в популяции и сокращение риска распространения вируса. Однако

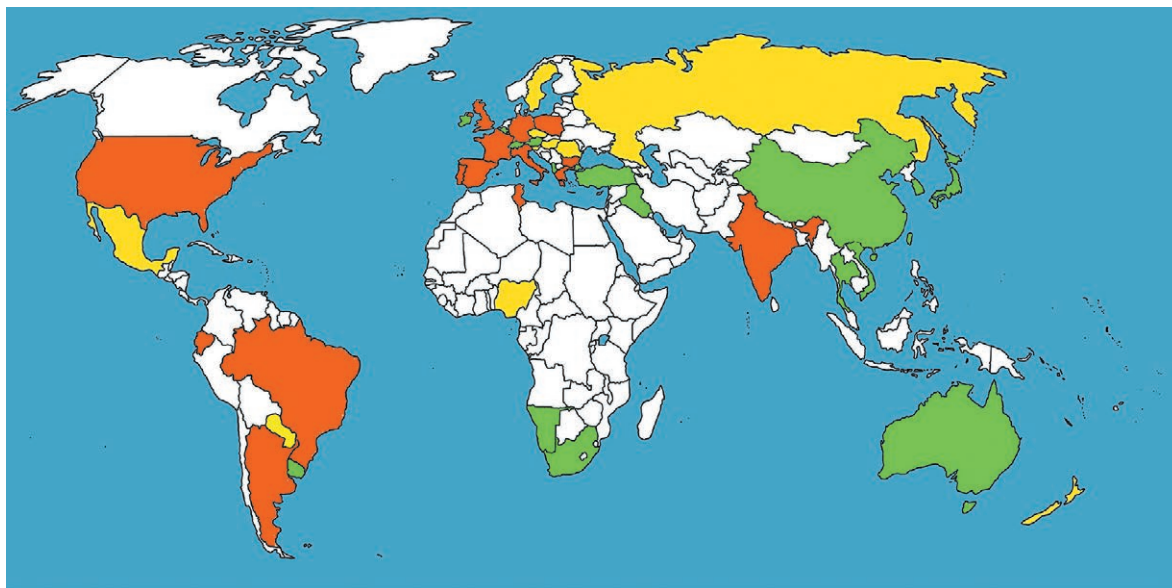


Рис. 5. Географическое распределение в мире трех вариантов CPV-2.

Оранжевый – наличие трех вариантов вируса; зеленый – наличие двух из трех вариантов вируса; желтый – наличие одного из трех вариантов вируса [4] (<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.000540>)

Fig. 5. Global geographic distribution of three CPV-2 variants.

Orange areas – presence of three virus variants; green areas – presence of two out of three virus variants; yellow areas – presence of one out of three virus variants [4] (<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.000540>)

циркулирующие полевые антигенные варианты вируса полностью заменили исходный тип CPV-2 [3, 4, 7, 10], который до сих пор используется при производстве большинства коммерческих вакцин, и поэтому вопрос эффективности используемых вакцин остается открытым.

Согласно литературным данным об эпизоотической ситуации по парвовирусной инфекции собак в мире, варианты CPV-2 (CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c) были зарегистрированы в 42 странах на пяти континентах (рис. 5).

В настоящее время CPV-2a, CPV-2b и CPV-2c неравномерно распространены по всему миру. В странах континентальной Европы регистрируется совместная циркуляция вариантов вируса. Так, во Франции и Бельгии отмечено преобладание типов CPV-2a и CPV-2b, в Италии – типов CPV-2a и CPV-2c, в Восточной Европе – типа CPV-2a, на Иберийском полуострове – типа CPV-2c, в Германии одинаково распространены все три варианта вируса. В Северной и Южной Америке регистрируется циркуляция CPV-2b/2c и CPV-2a/2c. В Азии, Великобритании, Австралии и Японии преобладают типы CPV-2a и CPV-2b. На севере Африки совместно циркулируют все три типа CPV-2, а на юге чаще встречаются CPV-2a и CPV-2b [4, 10].

В ранних наших исследованиях сообщалось, что уровни заражения собак парвовирусом были выше весной и осенью. Возможно, это связано с увеличением количества бездомных животных в данный период. Другой не менее важный фактор – высокая устойчивость вируса к физико-химическим воздействиям, а также возможность его сохранения во внешней среде до нескольких месяцев [1, 9, 11].

Анализ динамики заболеваемости собак парвовирусной инфекцией в Центральном федеральном округе РФ в 2017–2019 гг. выявил наибольшее количество больных животных в весенние и осенние периоды (рис. 6). Увеличение количества собак, заболевших

парвовирусным энтеритом, отмечали с апреля по июнь и с октября по декабрь 2018 и 2019 гг. На рисунке 6 видно, что пик заболеваемости животных в 2019 г. пришелся на позднюю осень и первый месяц зимы. Установлено, что на протяжении трех лет количество зарегистрированных случаев заболевания парвовирусным энтеритом собак в данном регионе выросло.

В Северо-Западном федеральном округе в 2017 г. парвовирусный энтерит у собак регистрировался в течение всего года. Количество больных животных увеличивалось начиная с марта по декабрь, пик заболеваемости отмечался с июля по сентябрь. Однако в 2018–2019 гг. отмечено снижение количества случаев

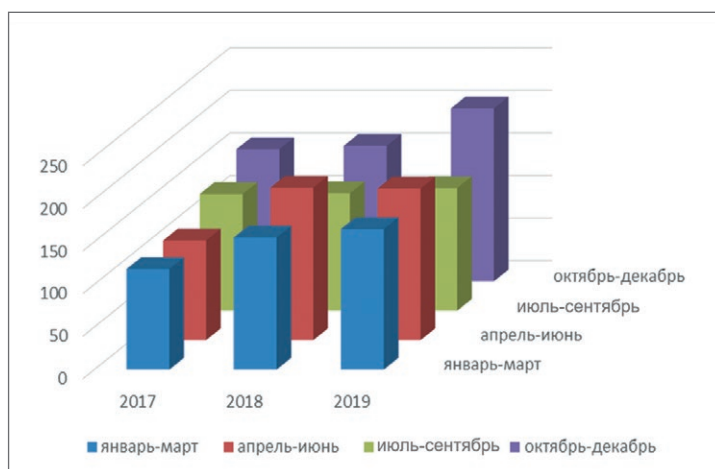


Рис. 6. Динамика заболеваемости собак парвовирусным энтеритом в Центральном федеральном округе в 2017–2019 гг.

Fig. 6. Morbidity dynamics of canine parvovirus enteritis in the Central Federal District in 2017–2019

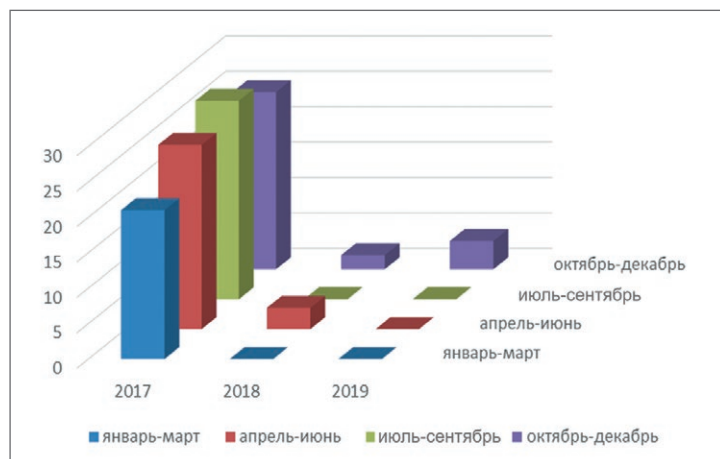


Рис. 7. Динамика заболеваемости собак парвовирусным энтеритом в Северо-Западном федеральном округе в 2017–2019 гг.

Fig. 7. Morbidity dynamics of canine parvovirus enteritis in the Northwestern Federal District in 2017–2019

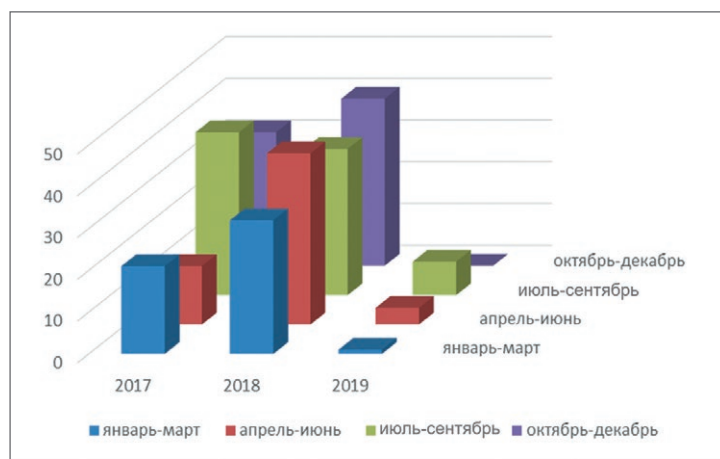


Рис. 8. Динамика заболеваемости собак парвовирусным энтеритом в Уральском федеральном округе в 2017–2019 гг.

Fig. 8. Morbidity dynamics of canine parvovirus enteritis in the Urals Federal District in 2017–2019

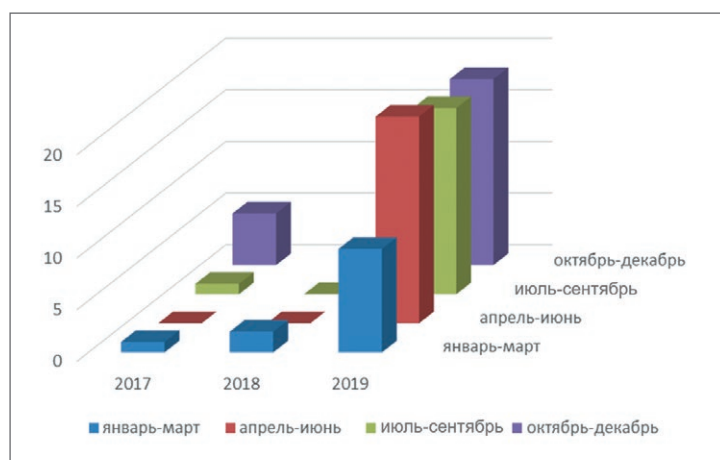


Рис. 9. Динамика заболеваемости собак парвовирусным энтеритом в Сибирском федеральном округе в 2017–2019 гг.

Fig. 9. Morbidity dynamics of canine parvovirus enteritis in the Siberian Federal District in 2017–2019

инфицирования парвовирусом собак, его регистрировали в единичных случаях весной и поздней осенью (рис. 7).

На рисунке 8 видно, что в Уральском федеральном округе в 2017 г. количество больных парвовирусным энтеритом собак увеличивалось начиная с июля по декабрь. Заболеваемость собак в 2018 г. была высокой в течение всего года, пик приходился на весну и осень. В 2019 г. единичные случаи заболевания были зарегистрированы с апреля по сентябрь.

В Сибирском федеральном округе парвовирусный энтерит у собак в 2017–2018 гг. встречался в единичных случаях, а в 2019 г. заболевание регистрировалось в течение всего года, количество больных животных увеличивалось начиная с марта по декабрь (рис. 9).

Анализ динамики заболеваемости собак парвовирусным энтеритом в Дальневосточном федеральном округе в 2017 г. показал, что наибольшее количество больных животных приходилось на период с апреля по июнь, а в 2018 г. пик заболеваемости был с января по март. В 2019 г. парвовирусную инфекцию собак не регистрировали. В результате проведенного анализа отметили, что в Дальневосточном федеральном округе на протяжении трех лет идет снижение количества зарегистрированных случаев заболевания парвовирусным энтеритом у собак (рис. 10).

Анализируя данные за последние три года по г. Байконуру, можно отметить, что наблюдается увеличение регистрируемых случаев заболевания собак парвовирусным энтеритом. Сезонность заболеваемости наглядно представлена на рисунке 11, на котором видно, что пик ее в 2017 г. приходился на позднюю осень, а в 2018 г. – на летне-осенний период. Однако в 2019 г. повышение количества случаев инфицирования парвовирусом собак отмечено в весенне-летний период.

Таким образом, проведенный анализ эпизоотической ситуации по парвовирусному энтериту собак в отдельных субъектах Российской Федерации за 2017–2019 гг. показал, что заболевание фиксируется круглогодично, но частота регистрируемых случаев зависит от сезона. Заражение собак парвовирусом чаще происходит весной, поздней осенью и ранней зимой. Это может быть связано со значительными колебаниями суточной температуры и климатическими различиями в течение этих сезонов в отдельных федеральных округах страны и, вероятно, с резистентностью организма животных, снижение которой увеличивает риск возникновения заболевания.

Несмотря на обширную вакцинацию, основная причина широкого распространения вируса по-прежнему представлена либо вмешательством материнских антител у вакцинированных щенков (так называемым окном восприимчивости), либо низкой эффективностью иммунной защиты у взрослых собак. Еще одной причиной является то, что циркулирующие полевые изоляты CPV-2 полностью заменили исходный тип вируса, используемый в производстве большинства коммерческих вакцин, который, возможно, не обеспечивает эффективную перекрестную защиту.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ результатов научных исследований по данной теме показал, что парвовирус 2-го типа имеет широкое распространение по всему миру и циркулирует на территории Российской

Федерации. Проанализированные данные по эпизоотической ситуации по парвовирусному энтериту собак в отдельных субъектах России за последние три года свидетельствуют о корреляции сезонности и частоты регистрируемых случаев заболевания.

Следует отметить необходимость проведения мониторинга циркуляции и распространения парвовируса с целью изучения генетических и антигенных свойств вновь выявляемых изолятов для своевременного обновления вакцинных штаммов, используемых при создании средств специфической профилактики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 2–4, 6–8, 10 см. REFERENCES)

1. Парвовирусы. В кн.: Шуляк Б. Ф. Вирусные инфекции собак. М.: Олита; 2004; 128–170.
5. Рахманина М. М., Сулимов А. А., Селиванов А. В. Биологические свойства парвовируса собак. *Ветеринария*. 1992; 7–8: 21–26.
9. Галкина Т. С. Иммунобиологические свойства возбудителей парвовирусного энтерита и чумы плотоядных, используемых для изготовления биопрепаратов: автореф. дис. ... канд. вет. наук. Владимир; 2008. 25 с.
11. Галкина Т. С., Глобенко Л. А. Эпизоотическая ситуация по парвовирусному энтериту у собак в г. Владимире. *Ветеринарная патология*. 2007; 3 (22): 51–55. eLIBRARY ID: 16885229.

REFERENCES

1. Parvoviruses [Parvovirozy]. In: Shulyak B. F. *Canine viral infections* [Virusnye infekcii sobak]. M.: Olita; 2004; 128–170. (in Russian)
2. Decaro N., Buonavoglia C. Canine parvovirus – a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet. Microbiol.* 2012; 155 (1): 1–12. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.09.007.
3. Gallo Calderón M., Wilda M., Boado L., Keller L., Malirat V., Iglesias M., Mattion N., La Torre J. Study of canine parvovirus evolution: comparative analysis of full-length VP2 gene sequences from Argentina and international field strains. *Virus Genes*. 2012; 44 (1): 32–39. DOI: 10.1007/s11262-011-0659-8.
4. Miranda C., Thompson G. Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. *J. Gen. Virol.* 2016; 97 (9): 2043–2057. DOI: 10.1099/jgv.0.000540.
5. Rakhmanina M. M., Sulimov A. A., Selivanov A. V. Biological properties of canine parvovirus [Biologicheskie svoystva parvovirusa sobak]. *Veterinariya*. 1992; 7–8: 21–26. (in Russian)
6. Hoelzer K., Shackelton L. A., Parrish C. R., Holmes E. C. Phylogenetic analysis reveals the emergence, evolution and dispersal of carnivore parvoviruses. *J. Gen. Virol.* 2008; 89 (Pt 9): 2280–2289. DOI: 10.1099/vir.0.2008/002055-0.
7. Drane D. P., Hamilton R. C., Cox J. C. Evaluation of a novel diagnostic test for canine parvovirus. *Vet. Microbiol.* 1994; 41 (3): 293–302. DOI: 10.1016/0378-1135(94)90109-0.
8. Truyen U. Evolution of canine parvovirus – a need for new vaccines? *Vet. Microbiol.* 2006; 117 (1): 9–13. DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.04.003.
9. Galkina T. S. Immunobiological properties of parvovirus enteritis and distemper agents used for production of biologicals [Immunobiologicheskie svoystva возбуdiviteley parvovirusnogo enterita i chumy plotoyadnyh, ispol'zuemyh dlya izgotovleniya biopreparatov]: thesis abstract Candidate of Science (Veterinary Medicine). Vladimir; 2008. 25 p. (in Russian)
10. Miranda C., Parrish C. R., Thompson G. Epidemiological evolution of canine parvovirus in the Portuguese domestic dog population. *Vet. Microbiol.* 2016; 183: 37–42. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.11.037.

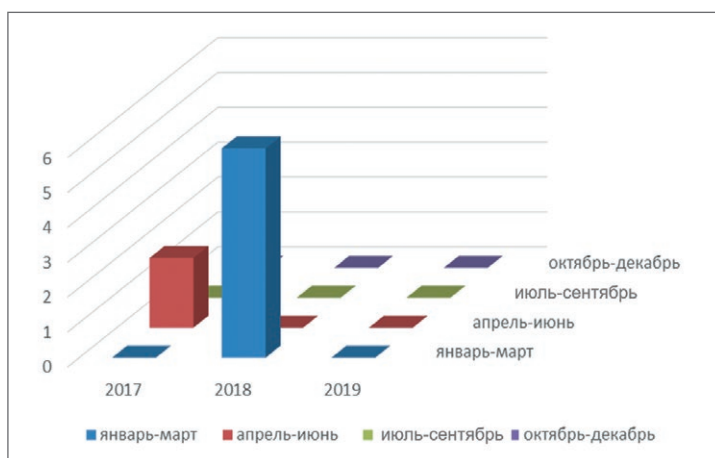


Рис. 10. Динамика заболеваемости собак парвовирусным энтеритом в Дальневосточном федеральном округе в 2017–2019 гг.

Fig. 10. Morbidity dynamics of canine parvovirus enteritis in the Far Eastern Federal District in 2017–2019

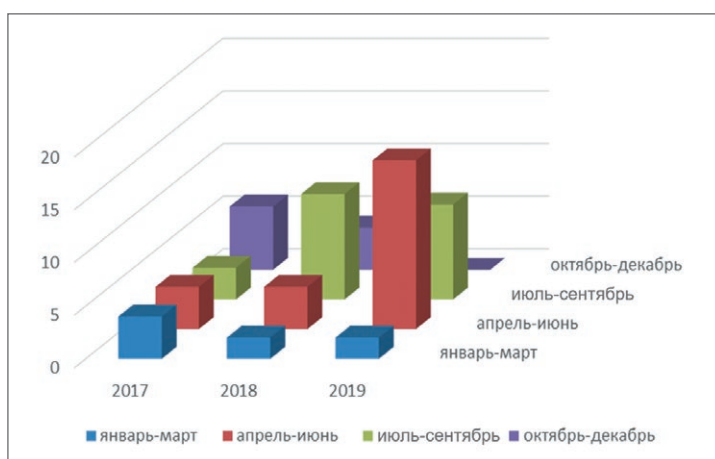


Рис. 11. Динамика заболеваемости собак парвовирусным энтеритом в г. Байконуре в 2017–2019 гг.

Fig. 11. Morbidity dynamics of canine parvovirus enteritis in Baikonur city in 2017–2019

11. Galkina T. S., Globenko L. A. Epidemic situation on canine parvovirus enteritis in Vladimir. *Veterinarnaya patologiya*. 2007; 3 (22): 51–55. eLIBRARY ID: 16885229. (in Russian)

Поступила 20.10.2020

Принята в печать 23.11.2020

Received on 20.10.2020

Approved for publication on 23.11.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Галкина Татьяна Сергеевна, кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией профилактики болезней мелких домашних животных ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Караулов Антон Константинович, кандидат ветеринарных наук, руководитель ИАЦ ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Tatyana S. Galkina, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Laboratory for Prevention of Small Pet Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Anton K. Karaulov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Определение родового состава грибов и общей токсичности кормов, произведенных на территории Республики Крым

С. С. Ибрагимова¹, О. В. Прунтова², С. И. Данильченко³, Е. С. Ерофеева⁴

^{1,3,4} Филиал ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») в Республике Крым, г. Симферополь, Россия

² ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ ORCID 0000-0003-3886-7702, e-mail: ibragimova@arriah.ru

² ORCID 0000-0003-3143-7339, e-mail: pruntova@arriah.ru

³ ORCID 0000-0001-7796-7349, e-mail: danylchenko@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0001-5060-6105, e-mail: erofeeva@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Микотоксикозы животных, причиной которых является употребление загрязненных токсинообразующими микромицетами кормов, представляют серьезную проблему для сельского хозяйства и имеют большое значение при производстве сельскохозяйственной продукции. В период с 2017 по 2019 г. проведен анализ кормов и кормового сырья, произведенных на территории Республики Крым, на содержание и родовой состав плесневых грибов, изучена общая токсичность кормовой продукции методом постановки биопробы на кроликах. Для проведения исследований было отобрано 252 образца, из которых большую часть составили зерновые корма – 124 пробы; 70 проб были представлены грубыми кормами, 58 – комбикормами. В результате проведенных исследований установлено, что основными загрязнителями были представители таких родов, как: *Mucor* (67,9%), *Penicillium* (26,6%), *Aspergillus* (13,1%), *Fusarium* (9,1%), *Alternaria* (8,7%), *Stachybotrys* (3,6%) и *Rhizopus* (2,0%). Выявили, что корма подвержены загрязнению плесневыми грибами как в период вегетации и уборки, так и во время перевозки и хранения. Так, микромицетами родов *Penicillium* (37,8%) и *Stachybotrys* (6,7%) чаще были загрязнены корма весной; токсинообразующими плесневыми грибами родов *Fusarium* (14,9%), *Alternaria* (13,9%) и *Rhizopus* (3,0%) – корма, отобранные и исследованные осенью; представителей родов *Mucor* (78,0%) и *Aspergillus* (22,0%) наиболее часто выявляли в зимний период. При определении общей токсичности кормов и кормовой продукции установили, что из 124 исследуемых образцов зерновых кормов слаботоксичными были 9 (7,3%), токсичными – 10 проб (8,1%). Из 58 испытываемых образцов комбикорма слабую токсичность проявили 5 проб (8,6%), а выраженную токсичность – 2 образца (3,4%). Показано, что самый высокий процент токсичного корма выявляли в весенний период (25,0%), зимой данный показатель составил 18,2%, осенью – 13,7%, летом – 4,5%.

Ключевые слова: плесневые грибы, микологический анализ, микромицеты, загрязнение, общая токсичность.

Благодарность: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Ибрагимова С. С., Прунтова О. В., Данильченко С. И., Ерофеева Е. С. Определение родового состава грибов и общей токсичности кормов, произведенных на территории Республики Крым. *Ветеринария сегодня*. 2020; 4 (35): 290–297. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-290-297.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Ибрагимова Селиме Серверовна, аспирант, руководитель сектора Филиала ФГБУ «ВНИИЗЖ» в Республике Крым, 295494, Россия, г. Симферополь, пос. Комсомольское, ул. Шоссейная, 21А, e-mail: ibragimova@arriah.ru.

UDC 619:615.9:636.085

Determination of fungal genera composition and total toxicity of feed produced in the Republic of Crimea

S. S. Ibragimova¹, O. V. Pruntova², S. I. Danilchenko³, Ye. S. Yerofeeva⁴

^{1,3,4} Branch of FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH") in the Republic of Crimea, Simferopol city, Russia

² FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ ORCID 0000-0003-3886-7702, e-mail: ibragimova@arriah.ru

² ORCID 0000-0003-3143-7339, e-mail: pruntova@arriah.ru

³ ORCID 0000-0001-7796-7349, e-mail: danylchenko@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0001-5060-6105, e-mail: erofeeva@arriah.ru

SUMMARY

Animal mycotoxicoses caused by ingestion of toxicogenic micromycete-contaminated feed are of major concern for agricultural industry and of great importance for production of agricultural products. In 2017–2019, feed and raw feed materials produced in the Republic of Crimea were tested for mold fungi and genera

composition thereof; the feedstuffs were tested for total toxicity by bioassay in rabbits. A total of 252 samples including 124 grain feed samples, 70 forage samples, 58 mixed feed samples were selected for testing. Tests showed that the major detected contaminants were members of the following genera: *Mucor* (67.9%), *Penicillium* (26.6%), *Aspergillus* (13.1%), *Fusarium* (9.1%), *Alternaria* (8.7%), *Stachybotrys* (3.6%) and *Rhizopus* (2.0%). It was revealed that feed were exposed to mold fungi contamination during vegetation and harvesting as well as during transportation and storage. Thus, in spring the feed were more often contaminated with micromycetes of *Penicillium* genus (37.8%) and *Stachybotrys* genus (6.7%); feed collected and tested in autumn were more often contaminated with toxigenic mold fungi of *Fusarium* genus (14.9%), *Alternaria* genus (13.9%) and *Rhizopus* genus (3.0%); in winter members of *Mucor* genus (78.0%) and *Aspergillus* genus (22.0%) were most often detected in feed. Tests for determination of total toxicity showed that 9 (7.3%) and 10 (8.1%) samples out of 124 tested grain feed samples were low toxic and evidently toxic, respectively. Tests of mixed feed samples for toxicity showed that 5 samples (8.6%) and 2 (3.4%) samples out of 58 mixed feed samples were low toxic and evidently toxic, respectively. It was shown that the proportion of contaminated feed was the highest in spring (25.0%) as compared to proportion of the contaminated feed in winter (18.2%), in autumn (13.7%) and in summer (4.5%).

Key words: fungi, mycological analysis, micromycetes, contamination, total toxicity.

Acknowledgment: The experiment was carried out at the expense of the FGBl "ARRIAH" in the framework of the research topic "Animal Welfare".

For citation: Ibragimova S. S., Pruntova O. V., Danilchenko S. I., Yerofeeva Ye. S. Determination of fungal genera composition and total toxicity of feed produced in the Republic of Crimea. *Veterinary Science Today*. 2020; 4 (35): 290–297. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-290-297.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Selime S. Ibragimova, Post-Graduate Student, Head of Sector, FGBl "ARRIAH" Branch in the Republic of Crimea, 295494, Russia, Simferopol city, set. of Komsomolskoye, st. Shosseynaya, 21A, e-mail: ibragimova@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

В условиях интенсификации животноводства и птицеводства вопрос качества кормов приобретает особую актуальность. Беспокойство вызывает загрязнение кормов плесневыми грибами, которые являются продуцентами микотоксинов – низкомолекулярных вторичных метаболитов микромицетов [1, 2]. Многообразие микотоксинов, высокие уровни их токсичности, разнообразные формы проявления микотоксикозов придают этой проблеме высокую значимость.

В настоящее время известно более 100 тысяч различных видов грибов, среди которых более 250 являются токсинообразующими [2–4]. Среди микотоксинов различают афлатоксины, трихотеценовые микотоксины, охратоксины, фумонизин, зеараленон и его производные, алкалоиды спорыньи, циклопиазоновую кислоту, патулин, цитринин и др. Наиболее распространены и опасны: охратоксин А, дезоксиниваленол, Т-2 токсин, зеараленон, афлатоксин [5, 6].

Поражение кормов и кормовой продукции микотоксинами снижает питательную ценность первых и приводит к развитию обширной группы заболеваний неинфекционного происхождения – алиментарным микотоксикозам, которые могут протекать в острой и хронической формах. Клинические признаки и течение заболеваний зависят от степени поражения кормов, физиологического состояния организма и патогенных свойств грибов, контаминирующих кормовую продукцию. При остром микотоксикозе выражены нейротоксические симптомы: возбуждение или угнетение, общая слабость, нарушение координации движений, поражение желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой системы, ослабление рефлексов, судороги. При хроническом течении наблюдают угнетение, анемию, снижение веса и продуктивности, аборт [7, 8].

Контаминация кормов микотоксинами в невысоких концентрациях также представляет серьезную угрозу: при проникновении в организм сельскохозяйствен-

ных животных они частично накапливаются в тканях и органах и, метаболизируясь, могут попадать в продукцию животноводства (мясо, молоко, яйца). Так, афлатоксин В₁, поступивший в организм животного с кормом, трансформируется в афлатоксин М₁ и выделяется с молоком. Таким образом, продукты, полученные от животных, которым скармливали загрязненные микотоксинами корма, являются потенциальным источником токсичности для человека [1, 9].

Важно отметить, что микотоксины отличаются неравномерностью распределения – их концентрация в различных участках одной и той же партии корма существенно варьирует, сказываясь на результатах исследований [1].

Несоблюдение условий заготовки и хранения кормового сырья и готовых кормов является одной из основных причин развития плесневых грибов и, как следствие, приводит к изменению видового и количественного состава грибной микрофлоры. От степени поражения кормов токсинообразующими плесневыми грибами зависит уровень их контаминации микотоксинами [10].

По оценке Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (ФАО), ежегодно примерно 25% мирового урожая зерновых поражается микотоксинами. В большинстве стран мира содержание микотоксинов в кормах и пищевой продукции регламентировано. В Российской Федерации максимально допустимые уровни содержания микотоксинов нормируются техническими регламентами Таможенного союза 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» и 015/2011 «О безопасности зерна», ГОСТами и ТУ на виды продукции и кормов. Согласно литературным данным, в Российской Федерации наиболее часто выделяют дезоксиниваленол, Т-2 токсин, зеараленон и афлатоксин. Документов, регламентирующих допустимую видовую контаминацию плесневыми грибами, нет [11].

В свою очередь, микологический контроль кормов, направленный на выявление поражения плесневыми грибами, позволяет выявить контаминацию кормов и кормовой продукции токсинообразующими микромицетами на ранних стадиях. Представителями токсинообразующих микромицетов являются грибы рода *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Ustilago*, *Tilletia*, *Nigrospora* и др., которые при возникновении благоприятных условий (относительной влажности воздуха – 85–95%, температуре – 4–30 °C) способны продуцировать микотоксины [3]. В связи с этим важным этапом контроля качества кормов является микологический анализ.

Цель работы заключалась в определении родового состава плесневых грибов, контаминирующих кормовую продукцию, заготавливаемую на территории Республики Крым, изучении зависимости степени поражения плесневыми грибами от времени года, условий окружающей среды (температуры, влажности) и установлении общей токсичности кормов методом постановки биопробы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили образцы кормов и комбикормов, отобранные в фермерских и частных хозяйствах, расположенных на территории Республики Крым. Отбор проводился согласно ГОСТ ISO 6497-2014 «Корма. Отбор проб», ГОСТ 13586.3-2015 «Зерно. Правила приемки и методы отбора проб», ГОСТ 13496.0-80 «Комбикорма, сырье. Методы отбора проб».

Реактивы и питательные среды: вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72 «Вода дистиллированная. Технические условия», среды Чапека – Докса и Сабуро (ООО «НПЦ «Биокомпас-С», Россия), бумага фильтровальная, формальдегид, поверхностно-активное вещество ОП-7, аммиак, ацетон ч.д.а. (ООО «Хлорен-Хима», Россия), масло подсолнечное рафинированное по ГОСТ 1129-2013 «Масло подсолнечное. Технические условия».

Лабораторные животные: кролики живой массой от 2,0 до 2,5 кг с целостным кожным покровом без пигментирования.

Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с межгосударственными стандартами по содержанию и уходу за лабораторными животными ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» и ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур», принятыми Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации, а также согласно требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях.

Методы пробоподготовки: микологический анализ проводили в соответствии с ГОСТ 13496.6-71 «Комбикорм. Метод выделения микроскопических грибов» и «Методическими указаниями по санитарно-микологической оценке и улучшению качества кормов» (утв. МСХ СССР 25.02.1985) посредством посева испытуемого материала в чашки Петри на агаризованные

питательные среды для культивирования плесневых грибов. Исследования проводили в 5 повторностях. Посевы термостатировали в течение 10 сут при 25 °C. Осмотр чашек Петри осуществляли на 3, 5, 7 и 10-е сут инкубации [12, 13].

Контроль чистоты термостата и стерильности бокса выполняли согласно «Методическим указаниям по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» [14]. Перед проведением посева на рабочий стол в боксе и в термостат помещали по 2 чашки Петри с агаровой средой, открывали их на 15 мин, затем термостатировали чашки аналогично посевному материалу.

При испытаниях зерновых кормов изучали поверхностную и внутреннюю заспоренность. Поверхностную заспоренность зерен определяли, помещая испытуемый материал в чашки Петри на поверхность среды Сабуро по 10 штук таким образом, чтобы они не соприкасались друг с другом.

Определение внутренней заспоренности проводили путем посева зерен, обработанных 3%-м раствором формальдегида (время экспозиции 2 мин), после завершения экспозиции промывали однократно 0,2%-м раствором аммиака, затем дистиллированной водой и раскладывали на поверхность агара Сабуро по 10 зерен в чашку. Количество параллелей – 5 чашек Петри на исследование.

Грубые корма измельчали на части длиной по 2 см в стерильную чашку Петри, затем стерильным пинцетом переносили кусочки на поверхность агара Чапека по 10 отрезков корма в 5 чашек Петри [13].

Гранулированные комбикорма измельчали на лабораторной мельнице ЛЗМ-1, отбирали 10 г и заливали 100 мл 0,1%-го водного раствора поверхностно-активного вещества ОП-7, получая таким образом первичную взвесь. Методом последовательных разведений готовили взвесь 1:1000 для доброкачественного корма и 1:10 000 для корма с признаками порчи (наличие видимых поражений плесневыми грибами, характерного запаха и др.). При разведении 1:1000 посев осуществляли на 5 чашках Петри с агаровой средой, при 1:10 000 – на 8 чашках [12, 13].

Определение родовой принадлежности грибов проводили по морфологическим характеристикам колоний, строению мицелия и спорангиев [15].

Определение общей токсичности кормов. Для определения общей токсичности испытуемые образцы измельчали и просеивали через сито с отверстиями диаметром 1 мм. Измельченный образец в количестве 50 г переносили в коническую колбу с прилифрованной пробкой вместимостью 500 см³ и приливали 150 см³ ацетона. Колбу помещали на орбитальный шейкер и экстрагировали в течение 3 ч. Полученный экстракт фильтровали через бумажный фильтр и переносили в чашку для выпаривания. Концентрировали до полного удаления запаха растворителя и получения маслянистого остатка. Если объема экстракта после выпаривания было недостаточно для проведения исследования, к нему добавляли растительное масло и доводили общий объем пробы до 1 см³ [13].

Биопробу ставили на кроликах без признаков шелушения, пигментирования и нарушения целостности кожных покровов. Растительное масло, используемое для разбавления экстракта, предварительно проверяли на токсичность путем двукратного нанесения на

выстриженный участок кожи с интервалом в 24 ч. Учет кожной реакции осуществляли на следующий день после повторного нанесения и продолжали в течение 3 сут. Растительное масло не вызвало покраснения эпидермиса животных и было признано пригодным к применению.

Затем на предварительно выстриженный в области бедра или лопатки участок кожи размером 6 × 6 см стеклянной лопаткой, слегка втирая, наносили половину экстракта. Вторую половину экстракта наносили на следующий день. До повторного нанесения маслянистый экстракт испытуемого корма хранили в холодильной камере. Кожную реакцию учитывали на следующий день после повторного нанесения экстракта и продолжали наблюдение в течение 3 сут.

В качестве контроля использовали один оголенный участок кожи размером 6 × 6 см, на который не наносили экстракт. На одном кролике одновременно ставили не более 4 проб.

Оценку результатов исследования токсичности кормов проводили по наличию или отсутствию воспалительной реакции. При появлении выраженной гиперемии, болезненности, отека, проявляющейся сильным утолщением кожи, а также появлении язв и сплошного струпа на участке кожи образец корма признавался токсичным [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первым этапом работы было установление степени зараженности кормов микромицетами и определение родового состава плесневых грибов, контаминирующих заготавливаемую на территории Республики Крым кормовую продукцию.

Исследования проводили на базе филиала ФГБУ «ВНИИЗЖ» в Республике Крым в период с 2017 по 2019 г.

Образцы кормов и кормовой продукции отбирали в частных и фермерских хозяйствах, расположенных на территории Белогорского, Красногвардейского, Ленинского и Сакского районов Республики Крым. Средняя масса проб составила 2,0 кг (для каждого отдельно отобранного образца). Количество отобранных образцов и период отбора отображены в таблице 1.

Для проведения исследований по выявлению токсикообразующих плесневых грибов и определению микологического пейзажа кормов, заготавливаемых на территории Республики Крым, было отобрано 252 образца, из которых большую часть составили зерновые корма – 124 пробы; 70 проб были представлены грубыми кормами, 58 – комбикормами. Для изучения зависимости степени контаминации кормовой продукции плесневыми грибами от условий окружающей среды (температуры воздуха и относительной влажности) отбор и исследование образцов проводили в разное время года.

Дифференциацию и определение родовой принадлежности плесневых грибов проводили с учетом морфологии выросших колоний, строение мицелия и спорангиев изучали методом световой микроскопии.

Результаты исследований по изучению плесневых грибов, контаминирующих заготавливаемые на территории Республики Крым корма, представлены в таблице 2.

В результате проведенных исследований по определению родового состава грибов, контаминирующих кормовую продукцию, микромицеты рода *Mucor* были обнаружены в 171 образце (67,9%), *Penicillium* – в 67 об-

Таблица 1
Характеристика исследуемых образцов корма

Table 1
Characterization of tested feed samples

Период отбора проб	Средняя масса отобранного образца	Количество отобранных образцов	Наименование образца
Зимний	2,0 кг	23	зерновые корма (ячмень, пшеница, овес)
		17	грубые корма (сено, солома)
		10	комбикорма
Весенний	2,0 кг	22	зерновые корма (ячмень, пшеница, овес)
		13	грубые корма (сено, солома)
		10	комбикорма
Летний	2,0 кг	30	зерновые корма (ячмень, пшеница, овес)
		12	грубые корма (сено, солома)
		14	комбикорма
Осенний	2,0 кг	49	зерновые корма (ячмень, пшеница, овес)
		28	грубые корма (сено, солома)
		24	комбикорма

разцах (26,6%), *Aspergillus* – в 33 образцах (13,1%), *Fusarium* – в 23 образцах (9,1%), *Alternaria* – в 22 образцах (8,7%), *Stachybotrys* – в 9 образцах (3,6%), *Rhizopus* – в 5 образцах (2,0%).

В зимний период было отобрано 50 образцов корма. При проведении микологических исследований в 39 образцах (78,0%) обнаружили плесневые грибы рода *Mucor*, в 11 образцах (22,0%) – *Aspergillus*, в 7 образцах (14,0%) – *Penicillium*, в 6 образцах (12,0%) – *Fusarium*, в 5 образцах (10,0%) – *Alternaria*, в 2 образцах (4,0%) – *Stachybotrys*, в 1 образце (2,0%) – *Rhizopus*.

В весенний период было отобрано 45 проб кормов, в 33 из них (73,3%) обнаружили плесневые грибы рода *Mucor*, в 17 (37,8%) – *Penicillium*, в 9 (20,0%) – *Aspergillus*. На микромицеты родов *Alternaria* и *Stachybotrys* пришлось по 3 случая выявления, что составляет 6,7% для каждого. В 1 образце исследуемых кормов (2,2%) обнаружили *Rhizopus*.

Летом для исследования было отобрано 56 образцов корма. Контаминацию плесневыми грибами рода *Mucor* обнаружили в 43 образцах (76,8%), *Penicillium* – в 20 образцах (35,7%), на *Aspergillus* и *Fusarium* пришлось по 2 случая выявления (по 3,6%). Плесневые грибы родов *Stachybotrys* были выявлены в одном образце (1,8%).

В осенние месяцы для исследования отобрали 101 пробу, 56 из них (55,4%) были контаминированы грибами рода *Mucor*, 23 (22,8%) – *Penicillium*, 15 (14,9%) – *Fusarium*. В 14 образцах (13,9%) были выявлены грибы рода *Alternaria*, в 11 (10,9%) – *Aspergillus*, на микромицеты родов *Stachybotrys* и *Rhizopus* пришлось по 3 случая выявления (по 3,0%).

Таблица 2
Родовое разнообразие грибов, контаминирующих исследуемые корма

Table 2
Generic diversity of the fungi contaminating tested feed

Род выявленного микромицета	Наименование образца	Количество контаминированных образцов в различные периоды года				
		зимний	весенний	летний	осенний	всего выявлено
<i>Mucor</i>	зерновые корма	18	16	22	23	79
	грубые корма	13	10	9	17	49
	комбикорм	8	7	12	16	43
<i>Penicillium</i>	зерновые корма	4	9	14	12	39
	грубые корма	1	2	2	6	11
	комбикорм	2	6	4	5	17
<i>Alternaria</i>	зерновые корма	2	3	0	5	10
	грубые корма	0	0	0	4	4
	комбикорм	3	0	0	5	8
<i>Aspergillus</i>	зерновые корма	4	6	2	5	17
	грубые корма	4	3	0	3	10
	комбикорм	3	0	0	3	6
<i>Stachybotrys</i>	зерновые корма	1	1	1	0	3
	грубые корма	1	2	0	3	6
	комбикорм	0	0	0	0	0
<i>Fusarium</i>	зерновые корма	6	0	2	10	18
	грубые корма	0	0	0	2	2
	комбикорм	0	0	0	3	3
<i>Rhizopus</i>	зерновые корма	0	0	0	0	0
	грубые корма	1	0	0	1	2
	комбикорм	0	1	0	2	3

Согласно литературным данным, доминирующую роль в контаминации растительных кормов в Российской Федерации и странах Европы также играют грибы из родов *Rhizopus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Stachybotrys* и другие, родовое и видовое разнообразие которых зависит от климатических условий окружающей среды [3, 16, 17].

В результате проведенных исследований установили, что корма подвергаются контаминации плесневыми грибами как в период вегетации и уборки, так и во время перевозки и хранения. Часть представителей токсинообразующих микромицетов быстро растут и размножаются при температуре до 20 °С, другие – при 30–50 °С. Благоприятные условия для развития фитопатогенных микромицетов на стадии выращивания и несоблюдение технологии заготовки кормов могут привести к накоплению в продукции микотоксинов. Степень поражения токсинообразующими микромицетами кормов

напрямую влияет на уровень их контаминации микотоксинами и, как следствие, на безопасность сельскохозяйственной продукции и вероятность возникновения микотоксикозов у животных.

Анализ полученных результатов показал, что в зависимости от сезона года меняется микологический пейзаж кормов. Так, микромицетами родов *Penicillium* (37,8%) и *Stachybotrys* (6,7%) чаще были контаминированы корма весной; токсинообразующими плесневыми грибами *Fusarium* (14,9%), *Alternaria* (13,9%) и *Rhizopus* (3,0%) – осенью; представители родов *Mucor* (78,0%) и *Aspergillus* (22,0%) наиболее часто встречались в зимний период.

Учитывая прямое влияние степени поражения кормов токсинообразующими плесневыми грибами на уровень загрязнения кормов микотоксинами, следующим этапом работы было определение общей токсичности контаминированных микромицетами образцов кормов и кормовой продукции.

Таблица 3
Результаты исследований общей токсичности кормов

Table 3
Results of tests of feed for total toxicity

Период	Токсичность образцов					
	зерновые корма			комбикорм		
	нетоксичный	слаботоксичный	токсичный	нетоксичный	слаботоксичный	токсичный
Зимний	18	2	3	9	1	0
Весенний	16	2	4	8	1	1
Летний	29	1	0	13	1	0
Осенний	42	4	3	21	2	1

Методом постановки биопробы на кроликах устанавливали токсичность 124 образцов зерновых и 58 образцов комбикорма. Оценку результатов исследования проводили по наличию или отсутствию воспалительной реакции и классифицировали по 3 категориям: токсичный, слаботоксичный и нетоксичный [13]. При появлении выраженной гиперемии, язв, отеков, проявлявшейся сильным утолщением кожи, сплошного струпа и болезненности на участке кожи с ранее нанесенным экстрактом испытуемого образца корма данный образец признавался токсичным. Экстракт слаботоксичного корма вызывал сохраняющуюся в течение 2–3 сут гиперемию, шелушение кожи, болезненность и отечность, проявлявшуюся незначительным утолщением кожи с последующим образованием отдельных корочек. При отсутствии признаков воспалительной реакции или наличии гиперемии, сохраняющейся не более 2 сут после нанесения экстракта и не сопровождающейся шелушением кожи, образец признавался нетоксичным.

Результаты исследований общей токсичности кормов приведены в таблице 3.

В результате проведенных исследований установили, что из 124 образцов зерновых кормов слаботоксич-

ными были 9 (7,3%), токсичными – 10 (8,1%). Из 58 испытуемых образцов комбикорма слаботоксичными признали 5 (8,6%), выраженную токсичность проявили 2 образца (3,4%).

В зимний период было исследовано 33 образца, из них токсичными были признаны 3 образца зерновых кормов (9,1%), слаботоксичными – 2 образца зерновых кормов (6,1%) и 1 образец комбикорма (3,0%).

В весенний период протестировали 32 образца, из которых токсичными были признаны 4 образца зерновых кормов (12,5%) и 1 образец комбикорма (3,1%), слаботоксичными – 2 образца зерновых кормов (6,3%) и 1 образец комбикорма (3,1%).

В летний период проанализировали 44 образца, из которых слабую токсичность выявили в 1 образце зерновых кормов (2,3%) и в 1 образце комбикорма (2,3%).

В осенний период было исследовано 73 образца, из них токсичными были признаны 3 пробы зерновых кормов (4,1%) и 1 образец комбикорма (1,4%), слаботоксичными – 4 образца зерновых кормов (5,5%) и 2 образца комбикорма (2,7%).

На рисунке показано, что самый высокий процент токсичного корма выявляли в весенний период (15,6%).



Рис. Общая токсичность кормов и кормовой продукции в зависимости от сезона года

Fig. Total toxicity of feed and feed products in different seasons of the year

Токсичность разной степени устанавливали в кормах и кормовой продукции на протяжении всех сезонов. Так, в осенний период было исследовано 73 образца, из которых токсичными признали 4 (5,5%), слаботоксичными – 6 (8,2%). Зимой из 33 исследуемых образцов слаботоксичными и токсичными признали по 3 образца, что составило по 9,1% выявлений. В весенний период из 32 образцов испытываемых кормов 5 образцов (15,6%) были признаны токсичными, 3 образца (9,4%) – слаботоксичными. Из 44 образцов, отобранных и исследованных в летний период, токсичного корма выявлено не было, слабую токсичность наблюдали только в 2 образцах, что составило 4,5%.

Корма и кормовую продукцию, признанные по результатам лабораторных исследований слаботоксичными и токсичными, скармливать сельскохозяйственным животным не допускается [18].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований было показано, что в зависимости от сезона года меняется микологический пейзаж кормов. Так, микромицетами родов *Penicillium* (37,8%) и *Stachybotrys* (6,7%) чаще были контаминированы корма весной; токсинообразующими плесневыми грибами *Fusarium* (14,9%), *Alternaria* (13,9%) и *Rhizopus* (3,0%) – корма, отобранные и исследованные осенью; представителей родов *Mucor* (78,0%) и *Aspergillus* (22,0%) наиболее часто выявляли в зимний период.

При определении общей токсичности кормов установили, что из 124 исследуемых образцов зерновых кормов слаботоксичными были 9 (7,3%), токсичными – 10 проб (8,1%). Из 58 испытываемых образцов комбикорма слаботоксичными признали 5 (8,6%), выраженную токсичность проявили 2 образца (3,4%).

Слабую токсичностью обладали корма на протяжении всех четырех сезонов: летом (4,5%), осенью (8,2%), зимой (9,1%) и весной (9,4%). Токсичными признаны образцы кормов, отобранные в осенний (5,5%), зимний (9,1%) и весенний (15,6%) периоды. Из 44 отобранных и исследованных в летний период образцов токсичного корма выявлено не было.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 4, 17 см. REFERENCES)

1. Иванов А. В., Трмасов М. Я., Папуниди К. Х., Чулков А. К. Микотоксикозы животных (этиология, диагностика, лечение, профилактика). М.: Колос; 2008. 133 с.
2. Попова О. М. Иммунобиологические, биохимические и микробиологические показатели коров при ассоциированном T-2 и аспергиллотоксикозе и их коррекция: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Казань; 2016. 40 с.
3. Якимова Э. А. Видовой состав и количественное содержание микроскопических грибов в кормах и кормовом сырье для животных. *Биотика*. 2015; 6 (7): 3–12. eLIBRARY ID: 26591267.
5. Трмасов М. Я., Папуниди К. Х., Семенов Э. И., Тарасова Е. Ю. Актуальные проблемы ветеринарной токсикологии. *Вестник ветеринарии*. 2012; 4 (63): 16–18. eLIBRARY ID: 18258778.
6. Коцаев А. Г., Хмара И. В. Особенности сезонной контаминации микотоксинами зернового сырья и комбикормов в Краснодарском крае. *Ветеринария Кубани*. 2013; 2: 29–30. eLIBRARY ID: 19008503.
7. Иванов И. И. Источники, распространение микотоксинов и профилактика микотоксикозов животных в Республике Марий Эл: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Казань; 2002. 18 с.
8. Папуниди К. Х., Трмасов М. Я., Фисинин В. И., Никитин А. И., Семенов Э. И. Микотоксины (в пищевой цепочке): монография. 2-е изд., доп. Казань: ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИИВ»; 2017. 158 с.
9. Медетханов Ф. А., Хайруллин Д. Д., Муллакаева Л. А., Овсянников А. П. Учебно-методическое пособие по ветеринарной токсикологии. Казань: ФГБОУ «КГАВМ»; 2017. 133 с.

10. Байбакова Ю. П., Хусаинов И. Т., Крючкова М. А., Трмасов М. Я., Ахметов Ф. Г. Санитарно-микологическая оценка качества кормов. *Ветеринарная медицина*. 2010; 94: 296–297.

11. Абакин С. С. Микотоксины: диагностика и профилактика. В кн.: *Сборник научных трудов Ставропольского научно-исследовательского института животноводства и кормопроизводства*. 2006; 2: 89–97. eLIBRARY ID: 17244251.

12. ГОСТ 13496.6–71. Комбикорм. Метод выделения микроскопических грибов (с Изменением № 1, 2). М.: Стандартинформ; 2011. 4 с. Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200024325>.

13. Методические указания по санитарно-микологической оценке и улучшению качества кормов. М.: ГУВ МСХ СССР; 1985. 68 с. Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200108240>.

14. МУ-287-113. Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России; 1998. Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200031410>.

15. ГОСТ 10444.12–2013. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества дрожжей и плесневых грибов. М.: Стандартинформ; 2014. 7 с. Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200107308>.

16. Потехина Р. М., Ермолаева О. К., Сагдеева З. Х., Семенов Э. И. Микологическая оценка кормов в Республике Татарстан. *Ветеринарный врач*. 2019; 1: 19–23. DOI: 10.33632/1998-698X.2019-1-19-24.

18. ГОСТ 31674–2012. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности. М.: Стандартинформ; 2014. 15 с. Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200096705>.

REFERENCES

1. Ivanov A. V., Tremasov M. Ya., Papunidi K. Kh., Chulkov A. K. Animal mycotoxicoses (etiology, diagnosis, treatment, prevention) [Mikotoksikozy zhivotnykh (etiologiya, diagnostika, lechenie, profilaktika)]. M.: Kolos; 2008. 133 p. (in Russian)
2. Popova O. M. Immunological, biochemical and microbiological characteristics of cows with T-2 and aspergillus-associated toxicosis and correction thereof [Immunobiologicheskie, biokhimicheskie i mikrobiologicheskie pokazateli korov pri associirovannom T-2 i aspergillotoksikoze i ih korrekciya]: Author's Abstract of Thesis for Doctor of Biology Degree. Kazan; 2016. 40 p. (in Russian)
3. Yakimova E. A. Generic composition and quantitative content of microscopic fungi in feed and raw feed materials for animals [Vidovoy sostav i kolichestvennoe sodержание mikroskopicheskikh gribov v kormah i kormovom syr'e dlya zhivotnykh]. *Biotika*. 2015; 6 (7): 3–12. eLIBRARY ID: 26591267. (in Russian)
4. Alshannaq A., Yu J.-H. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2017; 14: 632. DOI: 10.3390/ijerph14060632.
5. Tremasov M. Ya., Papunidi K. Kh., Semenov E. I., Tarasova E. Yu. Current problems of veterinary toxicology. *Vestnik veterinarii*. 2012; 4 (63): 16–18. eLIBRARY ID: 18258778. (in Russian)
6. Koshchayev A. G., Khmara I. V. Peculiarities of seasonal mycotoxin contamination of raw grain and mixed fodders in Krasnodar Region. *Veterinaria Kubani*. 2013; 2: 29–30. eLIBRARY ID: 19008503. (in Russian)
7. Ivanov I. I. Mycotoxin sources and distribution and mycotoxicosis prevention in animals in the Republic of Mariy-El [Istochniki, rasprostraneniye mikotoksinov i profilaktika mikotoksikozov zhivotnykh v Respublike Mariy El]: Author's Abstract of Thesis for Candidate of Science Degree (Biology). Kazan; 2002. 18 p. (in Russian)
8. Papunidi K. Kh., Tremasov M. Ya., Fisinin V. I., Nikitin A. I., Semenov E. I. Mycotoxins (in food chain) [Mikotoksiny (v pishchevoy cepochke)]: Monograph. 2nd edition, revised. Kazan: FGBSI "Federal Centre for Toxicological, Radiological and Biological Safety"; 2017. 158 p. (in Russian)
9. Medetkhanov F. A., Hairullin D. D., Mullakayeva L. A., Ovsyannikov A. P. Study guide for veterinary toxicology [Uchebno-metodicheskoe posobie po veterinarnoy toksikologii]. Kazan: FGBEI "Kazan State Academy of Veterinary Medicine"; 2017. 133 p. (in Russian)
10. Baybakova J. P., Husainov I. T., Kryuchkova M. A., Tremasov M. J., Ahmetov F. G. Sanitary-mycology evaluation of forage quality. *Veterinary Medicine*. 2010; 94: 296–297. (in Russian)
11. Abakin S. S. Mycotoxins: diagnosis and prevention [Mikotoksiny: diagnostika i profilaktika]. In: *Proceedings of the Stavropol Research Institute for Animal Farming and Feed Production*. 2006; 2: 89–97. eLIBRARY ID: 17244251. (in Russian)
12. GOST 13496.6–71. Mixed feed. Method of detachment of fungi (with amended No. 1, 2). M.: Standartinform; 2011. 4 p. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200024325>. (in Russian)
13. Methodical guidelines for sanitary and mycological evaluation of feed and for feed quality improvement [Metodicheskie ukazaniya po

sanitarno-mikologicheskoy ocenke i uluchsheniyu kachestva kormov]. M.: Main Veterinary Department of the USSR Ministry of Agriculture; 1985. 68 p. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200108240>. (in Russian)

14. MU-287-113. Methodical guidelines for disinfection, pre-sterilization cleaning and sterilization of medical devices [Metodicheskie ukazaniya po dezinfeckii, predsterilizacionnoj ochildke i sterilizacii izdelij medicinsko-go naznacheniya]. M.: Federal Centre for State Sanitary and Epidemiological Surveillance of the RF Ministry of Health; 1998. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200031410>. (in Russian)

15. GOST 10444.12-2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Methods for the detection and colony count of yeasts and moulds. M.: Standartinform; 2014. 7 p. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200107308>. (in Russian)

16. Potekhina R. M., Ermolaeva O. K., Sagdeeva Z. Kh., Semenov E. I. Mycological assessment of feed in the Republic of Tatarstan. *Veterinarnyy Vrach*. 2019; 1: 19–23. DOI: 10.33632/1998-698X.2019-1-19-24. (in Russian)

17. Richard J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – an overview. *Int. J. Food Microbiol.* 2007; 119 (1–2): 3–10. DOI: 10.1016/j.ijfood-micro.2007.07.019.

18. GOST 31674-2012. Feeds, compound feeds, material for compound feeds. Methods for the determination of common toxicity. M.: Standartinform; 2014. 15 p. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200096705>. (in Russian)

Поступила 28.09.2020

Принята в печать 29.10.2020

Received on 28.09.2020

Approved for publication on 29.10.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ибрагимова Селиме Серверовна, аспирант, руководитель сектора Филиала ФГБУ «ВНИИЗЖ» в Республике Крым, г. Симферополь, Россия.

Прунтова Ольга Владиславовна, доктор биологических наук, профессор, главный эксперт информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Данильченко Сергей Иванович, кандидат ветеринарных наук, руководитель лабораторно-диагностического центра Филиала ФГБУ «ВНИИЗЖ» в Республике Крым, г. Симферополь, Россия.

Ерофеева Елена Сергеевна, аспирант, заведующий лабораторией безопасности пищевых продуктов Филиала ФГБУ «ВНИИЗЖ» в Республике Крым, г. Симферополь, Россия.

Selime S. Ibragimova, Post-Graduate Student, Head of Sector, FGBI "ARRIAH" Branch in the Republic of Crimea, Simferopol city, Russia.

Olga V. Pruntova, Doctor of Science (Biology), Professor, Chief Expert, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Sergey I. Danilchenko, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Laboratory and Diagnostic Centre, FGBI "ARRIAH" Branch in the Republic of Crimea, Simferopol city, Russia.

Yelena S. Yerofeeva, Post-Graduate Student, Head of Food Safety Laboratory, FGBI "ARRIAH" Branch in the Republic of Crimea, Simferopol city, Russia.

Получение иммортализованной культуры клеток почки кролика

Б. Л. Манин¹, И. В. Вологина², Е. А. Трофимова³

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ ORCID 0000-0002-5263-1491, e-mail: manin_bl@arriah.ru

² ORCID 0000-0001-7536-6275, e-mail: vologina@arriah.ru

³ e-mail: mail@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Получение иммортализованных клеточных линий, происходящих из органов и тканей сельскохозяйственных животных, является актуальным направлением биотехнологии. В статье представлены результаты получения постоянной (иммортализованной) клеточной линии из первично трипсинизированной культуры клеток почки взрослого кролика. В процессе субкультивирования проводили цитоморфологические и кариологические исследования на 1, 3, 24, 31, 38, 56, 66, 75, 86, 101-м пассажах. При проведении длительных последовательных пассажей была прослежена динамика спонтанного формирования постоянной клеточной линии с использованием стандартных питательных сред и эмбриональной сыворотки. В отличие от известных клеточных линий, произошедших от обыкновенного домашнего кролика (*Oryctolagus cuniculus* L.), было отмечено, что иммортализация не сопровождалась увеличением продуктивности клеток и уменьшением их размеров. Размеры клеток полученной перевиваемой линии достигали в адгезированном состоянии 200 микрон, продуктивность составляла 7000 клеток на квадратный сантиметр. Значительные отличия (в сравнении с известными линиями) в процессе пассирования обнаруживались и в кариотипе. При стабилизации культуральных свойств постоянной линии клеток на 66–101-м пассажах генотип сформировался как околотетраплоидный. Известные клеточные линии – почка кролика (RK-13) и роговица глаза кролика (SIRC) – по кариотипу оказались псевдотриплоидные. Данная культура оказалась малочувствительной к вирусам – возбудителям болезней кроликов и чувствительной к гетерологичным вирусам свиней и крупного рогатого скота.

Ключевые слова: постоянная линия клеток, первично трипсинизированная культура, иммортализация, апоптоз, теломеры.

Благодарность: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках научно-исследовательских работ по теме «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Манин Б. Л., Вологина И. В., Трофимова Е. А. Получение иммортализованной культуры клеток почки кролика. *Ветеринария сегодня*. 2020; 4 (35): 298–303. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-298-303.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Манин Борис Леонидович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник сектора культуры клеток отдела инноваций ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: manin_bl@arriah.ru.

UDC 619:576.535:636.92:57.082.26

Preparation of rabbit kidney immortalized cell culture

B. L. Manin¹, I. V. Vologina², Ye. A. Trofimova³

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ ORCID 0000-0002-5263-1491, e-mail: manin_bl@arriah.ru

² ORCID 0000-0001-7536-6275, e-mail: vologina@arriah.ru

³ e-mail: mail@arriah.ru

SUMMARY

Preparation of immortalized cell lines obtained from organs and tissues of farm animals is an essential area of biotechnology. The paper presents results of continuous (immortalized) cell line preparation from a primary trypsinized cell culture of an adult rabbit kidney. Cytomorphologic analysis and karyotyping were performed during the process of subcultivation in the cell culture at passages 1, 3, 24, 31, 38, 56, 66, 75, 86, 101. Dynamics of spontaneous continuous cell line formation during long-term serial passaging was examined using standard nutrient media and fetal serum. Contrary to the known cell lines of rabbit origin (*Oryctolagus cuniculus* L.), immortalization was not accompanied with enhanced cell production and cell size reduction. The prepared continuous cell line in its adhesive phase was up to 200 µm in size and its productivity was about 7,000 cells/cm². Significant differences (compared to the known cell lines) in the karyotype were detected during passaging. The formed genotype was found to be near-tetraploid when the CCL cultural properties were stabilized at passages 66–101. The known cell lines – rabbit kidney (RK-13) and rabbit cornea (SIRC) – can be characterized as pseudotriploid basing on their karyotype. This culture demonstrated low sensitivity to viruses – causative agents of rabbit diseases and sensitivity to heterologous porcine and bovine viruses.

Key words: continuous cell line, primary trypsinized cell culture, immortalization, apoptosis, telomere.

Acknowledgements: The study was funded by the FGBI "ARRIAH" within the framework of "Veterinary Welfare" research work.

For citation: Manin B. L., Vologina I. V., Trofimova Ye. A. Preparation of rabbit kidney immortalized cell culture. *Veterinary Science Today*. 2020; 4 (35): 298–303. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-298-303.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Boris L. Manin, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Sector for Cell Culture, Innovation Department, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: manin_bl@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Иммортализация субкультивируемых клеток органов млекопитающих может рассматриваться как уход от терминальной остановки пролиферации, которая в конце концов настигает все нормальные соматические клетки. В начале 60-х гг. прошлого века L. Hayflick и P. S. Moorhead было сделано открытие, что нормальные диплоидные фибробласты человека пролиферируют *in vitro* только определенное число раз, после чего они навсегда прекращают деление и начинают стареть [1–3]. Поскольку процесс старения четко отличается от любой формы смерти клетки, например апоптоза, эти состояния в процессе проведения последовательных пассажей необходимо различать. Исследования, проведенные учеными в 1990-х гг., показали, что иммортализация связана с активацией механизма поддержания теломер с участием теломеразы или иного неизвестного процесса [2, 4]. Иммортализация представляется сложным процессом, связанным со многими генетическими изменениями, часть из которых может быть и не связана с поддержанием теломер [4]. Предполагается существование трех основных компенсаторных механизмов поддержания жизнеспособности и стимуляции пролиферации клеточных линий при потере генетического материала (теломер): полиплоидизация исходного клона клеток, амплификация онкогенов и экстракопирование целых аутосом или их фрагментов.

Специалистам, работающим с клеточными культурами, известно небольшое количество стабильных и технологичных постоянных линий клеток (ПЛК), произошедших от обыкновенного домашнего кролика (*Oryctolagus cuniculus* L.). Самыми распространенными линиями являются: RK-13 (почка кролика, получена в 1963 г.), SIRC (роговица глаза кролика, получена в 1965 г.), RSK (кожа кролика). При проведении исследований по идентификации постоянной линии клеток RSK, полученной из ВИЭВ, кариологическими методами установлена ее принадлежность к линиям свиного происхождения [5]. Остальные клеточные линии из каталога Российской коллекции клеточных культур (PKKK) с кратностью рассева 1:2 имеют статус субкультур [6]. Получение немалигнизированных постоянных (иммортализованных) клеточных линий млекопитающих, в том числе и из органов домашнего кролика, не производится стереотипными манипуляциями. Формирование стабильных ПЛК происходит спонтанно: при длительном пассировании в постоянных условиях либо при изменении условий культивирования – смене питательных сред, сывороток и других компонентов.

Для длительного пассирования клеток млекопитающих обычно используют органы новорожденных животных или их эмбрионов. Статус этих клеток предполагает более длительную митотическую активность *in vitro*.

Целью работы было получение первичной культуры клеток, чувствительной к поражающим кроликов вирусам, из почки взрослого животного и поддержание субкультуры при длительных последовательных пересевах, а также изучение степени трансформации полученной линии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования были взяты почки самца домашнего кролика в возрасте 4–5 мес. массой 2,0–2,5 кг. Первичную культуру получили модифицированным методом дробной трипсинизации [7–9]. После тестирования первичных и субкультивируемых клеток на чувствительность к вирусам, поражающим домашнего кролика, клетки субкультивировали на среде DMEM/F-12 (pH 7,1–7,2) с 0,1% гидролизата лактальбумина (ГЛА), содержащей 5–10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (КРС) [10]. В дальнейшем субкультуру адаптировали к среде ПСП (аналог MEM), содержащей тот же процент фетальной сыворотки.

Культивирование клеток из почки кролика проводили по общепринятой методике в стеклянных и пластиковых сосудах с различной ростовой площадью в термостате при температуре $(38,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

Исследование морфологии клеток. Морфология нативных клеток из первично трипсинизированной культуры изучалась с помощью фазово-контрастной микроскопии.

Для идентификации клеточных культур использовали кариологический метод получения метафазных пластинок по методике P. S. Moorhead (1960).

Прижизненное цитохимическое выявление микоплазменной контаминации и изучение морфологии клеток проводились с использованием красителя акридинового оранжевого в концентрации 0,001%.

В сравнительном аспекте изучались две стабильные широко распространенные постоянные клеточные линии кроличьего происхождения: RK-13 – почка кролика и SIRC – клетки роговицы глаза кролика.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Любое субкультивирование первичных клеток предполагает изучение возможности длительного непрерывного пассирования полученных популяций [11]. В связи с этим проводили мониторинг изменения цитогенетических и культуральных свойств клеток, полученных из почек взрослого кролика. Для этого начиная с 4-го пассажа субкультивирование проводили 2 раза в неделю с кратностью рассева 1:2, 1:3. Конфлюэция монослоя при этом была 100%, размеры клеток оставались крупными – до 50 мкм в диаметре [10]. С 4-го пассажа в среду культивирования кроме среды DMEM/F-12 добавляли ПСП (1/3), а с 45-го пассажа

культуру выращивали на среде ПСП с добавлением 10% фетальной сыворотки КРС (производство Германия).

В процессе субкультивирования проводились цитоморфологические и кариологические исследования на 1, 3, 24, 31, 38, 56, 66, 75, 86, 101-м пассажах. Примерно на этих же пассажах клетки криоконсервировали и затем изучали возможность их восстановления. Ампулы с клетками, полученными из почки взрослого кролика (ПКр), сконцентрированными до плотности $(2,0-5,0) \times 10^6$ кл./мл в свежей ростовой среде с 10% диметилсульфоксида, замораживали на программном устройстве и хранили в жидком азоте. Клетки размораживали при интенсивном перемешивании в водяной бане с температурой 37–38 °С. Выживаемость составляла 80–90%. Оптимальный уровень пролиферативной активности клеточной культуры, отмеченный перед замораживанием, достигался уже на 2-м пассаже после оттаивания (рис. 1).

Уровень и динамика пролиферации стабилизировались к 38-му пассажу. К этому же пассажу отмечалось уменьшение полиморфизма популяций. В отличие от первичных субкультивируемых популяций стали преобладать эпителиоподобные и веретенообразные клетки (рис. 2). В случае передержки культуры более 3 суток формировался псевдосинцитий (рис. 3), который не позволял просматривать и изучать цитоплазматические структуры. Клетки, выращенные в культуральных сосудах разной емкости, имели одинаковый морфологический статус.

На 101-м пассаже была проведена микрометрия клеток конфлюэнтного монослоя ПКр. На рисунке 4 приведена микрометрическая сетка, по которой определяются размеры клеток (минимальное деление – 10 мкм). Средний размер эпителиоподобных клеток варьировал от 30 до 50 мкм. Веретенообразные клетки достигали размера до 100 мкм. При формировании псевдосинцития количество клеток не увеличивалось, клетки переживали до 10 суток при температуре 37 °С, показатель pH при этом сильно не изменялся и был на уровне 6,9–7,0.

Как видно из таблицы, продуктивность субкультуры и формирующейся постоянной клеточной линии была не очень высокой. Кратность прироста на развернутой поверхности (300 см²) достигала 4,1 за четверо суток и 1,7 – во вращающихся сосудах (800 см²) за трое суток. При посевной концентрации 40 000 клеток в 1 мл через 4 ч адгезированные клетки занимали всю поверхность культурального флакона. Через 72 ч произошло уплотнение монослоя, продуктивность достигла 100 000 клеток в 1 мл.

Данные микрометрии клеток коррелировали с продуктивностью полученной клеточной линии, которая не превышала 130 000 на см².

Полученная клеточная культура использовалась в различных подразделениях ФГБУ «ВНИИЗЖ» для проведения вирусологических исследований. Она оказалась чувствительной к вирусам инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, классической чумы свиней, болезни Ауески. Были выявлены цитопатические

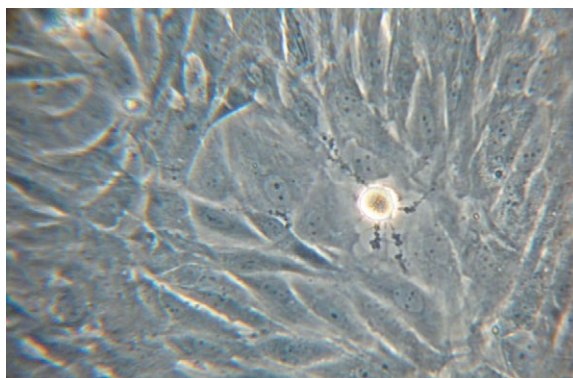


Рис. 1. Морфология клеток ПКр, 2-й пассаж

Fig. 1. Morphology of RK cells, passage 2

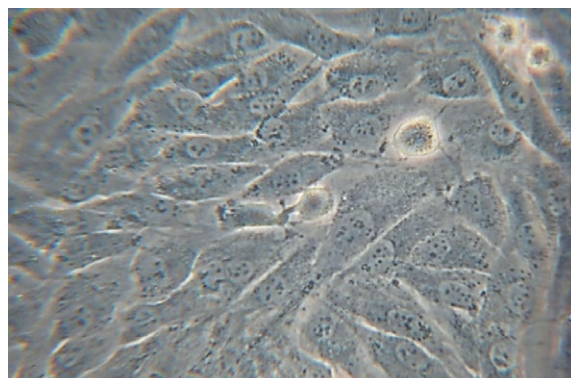


Рис. 2. Морфология клеток ПКр, 38–56-й пассаж

Fig. 2. Morphology of RK cells, passage 38–56

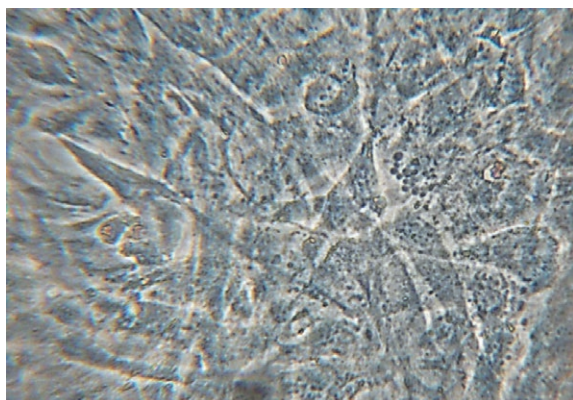


Рис. 3. Псевдосинцитий ПКр

Fig. 3. RK pseudosyncytium

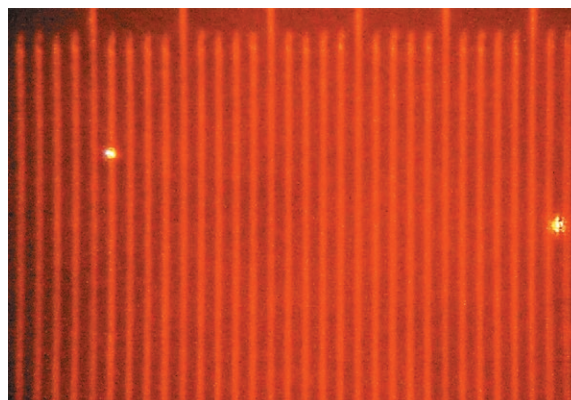


Рис. 4. Микрометрическая сетка, размер одного деления 10 мкм

Fig. 4. Micrometer grid, cell size – 10 μm

Таблица

Динамика пролиферации постоянной линии клеток ПКр в разных культуральных сосудах

Table

Dynamics of the RK continuous cell line proliferation in different culture media

Условия выращивания клеток в монослое	Посевная концентрация, млн/см ³	Время культивирования, сут	Продуктивность клеток, млн	Продуктивность клеток в 1 см ²	Кратность прироста
Стеклянный культуральный сосуд (клинический матрас), объем 1500 мл (300 см ²)	0,02	4	25,0 ± 0,2	83 000	4,1
	0,04	3	30,0 ± 0,2	100 000	2,5
	0,05	3	40,0 ± 0,1	130 000	2,6
Вращающийся сосуд, объем 3000 мл (800 см ²)	0,07	3	50,0 ± 0,2	62 000	1,7
	0,1	3	70,0 ± 0,2	87 000	1,7

изменения в культуре клеток ПКр после первого пассажа вируса миксоматоза кроликов. При дальнейшем пассировании происходило снижение цитопатического действия (ЦПД) вируса. ЦПД вируса геморрагической болезни кроликов на ПКр отсутствовало.

Основная цель работы не была достигнута, т. к. полученная клеточная линия оказалась малочувствительной к вирусам – возбудителям болезней кроликов. Но многие гетерологичные вирусы эффективно репродуцировались с увеличением титров в пассажах. Поэтому изучение цитологических и кариологических изменений в новой ПЛК было продолжено.

Цитокариологическая трансформация. При изучении цитокариологических признаков самых распространенных ПЛК, полученных из органов и тканей кролика, – RK-13 (почка кролика) и SIRC (роговица глаза кролика) – было выявлено, что обе эти культуры имеют околотриплоидный кариотип (рис. 5, 6) и отличную морфологию клеток с преобладанием эпителиоподобных клеток у RK-13 (рис. 7) и веретенообразных у SIRC (рис. 8).

У клеточной линии SIRC в оптимальных условиях культивирования продуцируется внеклеточный матрикс (вероятно, белкового происхождения),

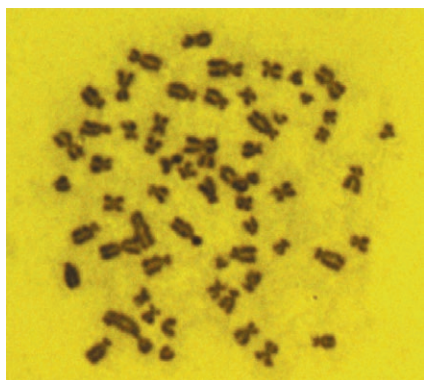


Рис. 5. Метафаза RK-13 (62 хромосомы)

Fig. 5. RK-13 Metaphase (62 chromosomes)

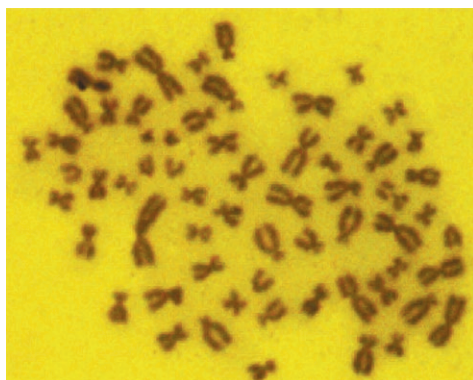


Рис. 6. Метафаза SIRC (65 хромосом)

Fig. 6. SIRC metaphase (65 chromosomes)

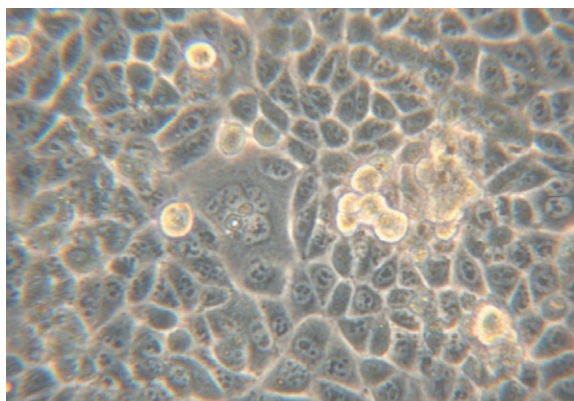


Рис. 7. Морфология ПЛК RK-13

Fig. 7. RK-13 CCL morphology

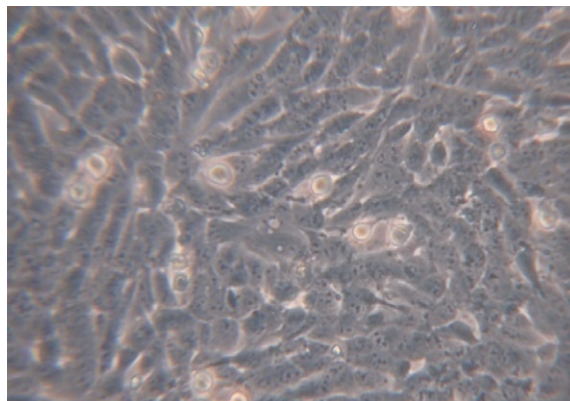


Рис. 8. Морфология ПЛК SIRC

Fig. 8. SIRC CCL morphology

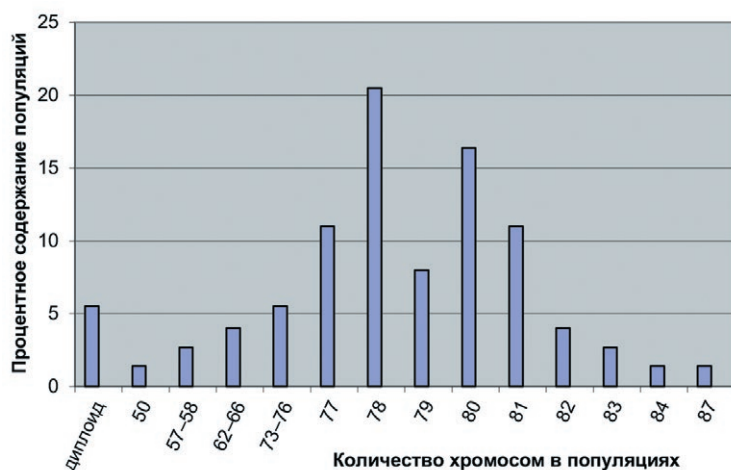


Рис. 9. Кариограмма клеточной линии ПКр, 38-й пассаж

Fig. 9. RK cell line ideogram, passage 38

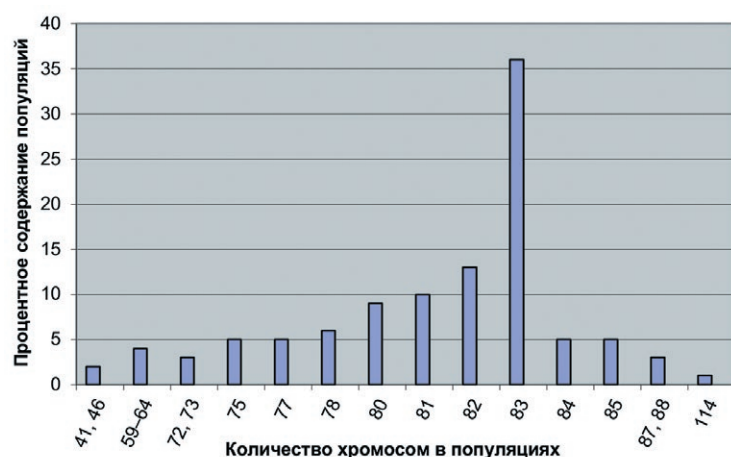


Рис. 10. Кариограмма клеточной линии ПКр, 56-й пассаж

Fig. 10. RK cell line ideogram, passage 56

который агрегирует клетки при трипсинизации и формировании монослоя. В данном случае одной из причин формирования постоянных клеточных линий, полученных из разных органов кролика, является уве-

личение генетического материала на 40–47% за счет экстракопирования аутосом. Вероятно, по этой причине увеличивается теломеразная активность клеток и формируется стабильный фактор иммортализации клеточных линий.

Околотриплоидный набор хромосом, по сравнению с нормальным, диплоидным, кариотипом, является стабильным и маркерным признаком длительного пассирования постоянных клеточных культур RK-13 и SIRC. Кратность рассева этих «старых» ПЛК достигает 1:4, 1:8.

Иммортализация клеточных линий значительно меняет цитоморфологические и физиологические свойства исходных клеток, полученных из тканей организма. Особенно это сказывается на чувствительности ПЛК к вирусам. Часто постоянные клеточные линии становятся нечувствительными к вирусам гомологичного происхождения и чувствительными (пермиссивными) к вирусам гетерологичного происхождения.

Так, клетки RK-13 чувствительны к вирусам африканской чумы лошадей, везикулярной болезни свиней, оспы КРС и в то же время к вирусам миксоматоза и оспы кроликов. Постоянная клеточная линия SIRC используется при репродукции вируса краснухи человека.

Как было отмечено выше, полученная клеточная линия ПКр стала проявлять признаки иммортализации после 30-го пассажа. Проведенный кариологический анализ показал тенденцию к гипердиплоидизации популяции клеток ПКр начиная с 38-го пассажа (рис. 9). С 56-го пассажа наблюдали преобладание околотетраплоидной популяции (рис. 10). Проведенные кариологические тестирования на 66, 75, 86 и 101-м пассажах показали стабильность околотетраплоидной популяции (от 77 до 83 хромосом) в кариотипе (рис. 11).

Вариабельность популяций ПЛК ПКр по количеству хромосом соответствовала вариабельности иммортализованной клеточной линии со стабильными цитоморфологическими и культуральными свойствами. Надо отметить, что количество полиплоидов при длительном пассировании в стандартных оптимальных условиях и передержке при температуре 37 °C до 10 суток было менее 1%.

При цитохимическом исследовании полученной из почки взрослого кролика ПЛК прослеживался полиморфизм как клеток, так и ядер (рис. 12). Этим методом не были обнаружены микоплазмы в межклеточном

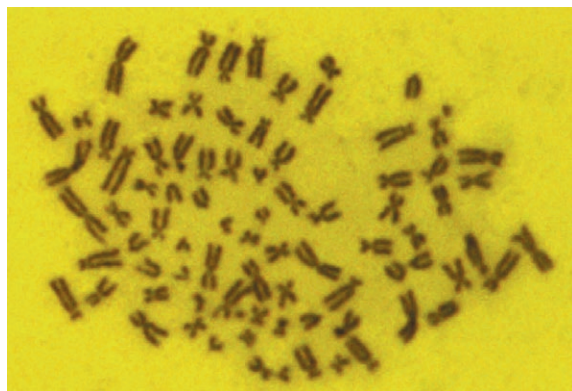


Рис. 11. Метафазная пластинка клеточной линии ПКр, 56-й пассаж, 83 хромосомы

Fig. 11. Metaphase plate of the RK cell line, passage 56, 83 chromosomes

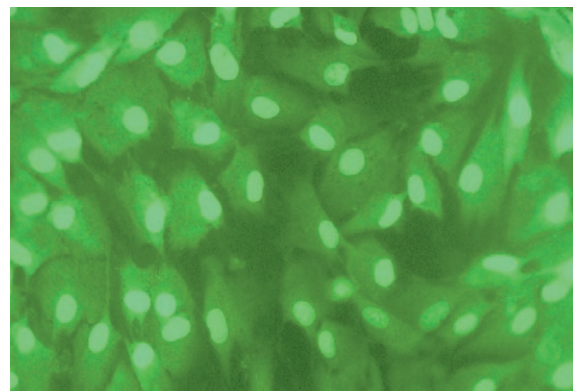


Рис. 12. Цитохимический препарат ПКр.

Окраска акридиновым оранжевым, объектив ×40

Fig. 12. RK cytochemical preparation.

Staining with acridine orange, lens ×40

пространстве и на мембранах клеток. Отсутствие лентной контаминации позволяет длительно пересевать (пассировать) данную ПЛК без изменения кратности посева, условий культивирования и без криопаузы.

Данная культура оказалась чувствительной к вирусам инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, классической чумы свиней, болезни Ауески. Были выявлены цитопатические изменения в культуре ПКр в результате действия вируса миксоматоза кроликов без нарастания титров в пассажах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммортализация клеточных культур, получаемых из органов сельскохозяйственных животных, имеет ряд закономерностей, которые являются причиной относительно небольшого количества постоянных культур. Например, постоянных линий клеток, произошедших от обыкновенного домашнего кролика (*Oryctolagus cuniculus* L.), всего пять. Общеизвестно, что вероятность спонтанного получения постоянных клеточных линий из органов эмбрионов и новорожденных животных выше, чем из органов взрослых животных, и такие клеточные линии предпочтительнее, поскольку содержат большое количество стволовых клеток с повышенной пролиферативной активностью [3]. Как показали Э. Л. Дункан и Р. Р. Реддел, спонтанная иммортализация нетуморогенного происхождения имеет непредсказуемые направления трансформации клеток *in vitro* [2, 11]. Полученные в данном исследовании результаты по стабилизации кариотипа ПЛК почки кролика на уровне тетраплоидности вносят новые перспективы в использование органов взрослых животных. Установлено, что полученная субкультура не отличалась высокой продуктивностью, но может служить субстратом для культивирования гетерологичных вирусов свиней и крупного рогатого скота.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. 1 см. REFERENCES)

- Дункан Э. Л., Реддел Р. Р. Генетические изменения, связанные с иммортализацией. *Биохимия*. 1997; 62 (11): 1477–1490. Режим доступа: <https://journals.belozersky.msu.ru/biochemistry-content/d/1997/11/1477-1490.pdf>.
- Мамаева С. Е. Закономерности кариотипической эволюции клеток в культуре. *Цитология*. 1996; 38 (8): 787–814.
- Полянская Г. Г. Кариотипическая изменчивость в клеточных линиях и структура кариотипа. *Клеточные культуры (информационный бюллетень)*. 2009; 24: 15–24.
- Манин Б. Л., Коропова Н. В., Трофимова Е. А. Идентификация постоянных клеточных линий животных по кариологическим, морфологическим и культуральным признакам. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. 2012; 10: 246–254. eLIBRARY ID: 18881531.
- Каталог. Российская коллекция клеточных культур (РККК). Ред. Г. П. Пинаев и др. СПб.; 2004. 315 с.
- Глаголева И. С., Плотникова Э. М. Возможность применения первичных культур клеток новорожденных крольчат в производстве вакцинных препаратов. *Гены и клетки*. 2014; 9 (3): 151–154. eLIBRARY ID: 29332365.

8. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии). Под ред. Л. П. Дьяконова; Рос. акад. с.-х. наук. 2-е изд. доп. М.: Спутник+; 2009. 656 с.

9. Плотникова Э. М., Кириллова Ю. М., Глаголева И. С. Подбор оптимальных условий роста первичной культуры клеток почек новорожденных кроликов. *Веткорм*. 2012; 4: 42–44. eLIBRARY ID: 20356980.

10. Вологина И. В., Манин Б. Л., Коропова Н. В. Оптимизация условий трипсинизации и культивирования первичных клеток почек кролика. *Достижения молодых ученых – в ветеринарную практику: материалы V Международной научной конференции (г. Владимир, 5–6 декабря 2019 г.)*. Под общ. ред. Д. А. Лозового. Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2019; 57–62. eLIBRARY ID: 41589695.

11. Реддел Р. Р., Брайан Т. М., Мернейн Д. П. Иммортализованные клетки без измеримой активности теломеразы. *Биохимия*. 1997; 62 (11): 1467–1476. Режим доступа: <http://journals.belozersky.msu.ru/biochemistry/paper/1997/11/1467>.

REFERENCES

- Hayflick L., Moorhead P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 1961; 25 (3): 585–621. DOI: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.
- Duncan E. L., Reddel R. R. Genetic changes associated with immortalization. *Biochemistry (Moscow)*. 1997; 62 (11): 1477–1490. Available at: <https://journals.belozersky.msu.ru/biochemistry-content/d/1997/11/1477-1490.pdf>. (in Russian)
- Mamaeva S. E. Regularities of cell karyotypic evolution in culture. *Tsitologiya*. 1996; 38 (8): 787–814. (in Russian)
- Poljanskaya G. G. Karyotypic variability in cell lines and karyotype structure [Kariotipicheskaya izmenchivost' v kletochnyh liniyah i struktura kariotipa]. *Cell cultures (information bulletin) [Kletochnye kul'tury (informatsionnyy byulleten')]*. 2009; 24: 15–24. (in Russian)
- Manin B. L., Koropova N. V., Trofimova Ye. A. Identification of continuous animal cell lines according to the karyological, morphological and cultural characteristics. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2012; 10: 246–254. eLIBRARY ID: 18881531. (in Russian)
- Catalogue. Russian collection of cell cultures (RCC) [Katalog. Rossijskaya kollekcija kletochnyh kul'tur (RKKK)]. Ed. by G. P. Pinayev, et al. SPb.; 2004. 315 p. (in Russian)
- Glagoleva I. S., Plotnikova E. M. Possibility of application primary cell culture of kidney newborn rabbits in vaccines production. *Genes Cells*. 2014; 9 (3): 151–154. eLIBRARY ID: 29332365. (in Russian)
- Animal cell in culture (methods and implementation in biotechnology) [Zhivotnaya kletka v kul'ture (metody i primeneniye v biotekhnologii)]. Ed. by L. P. Dyakonov; Russian Academy of Agricultural Sciences. 2nd ed., enlarged. M.: Sputnik+; 2009. 656 p. (in Russian)
- Plotnikova E. M., Kirillova J. M., Glagoleva I. S. Selection of optimal conditions for growth of primary cultures of kidney cells, but the newborns rabbits. *Veterinaria i kormlenie*. 2012; 4: 42–44. eLIBRARY ID: 20356980. (in Russian)
- Vologina I. V., Manin B. L., Koropova N. V. Optimization of conditions for primary rabbit kidney cell trypsinization and cultivation. *Achievements of early-career researchers – to veterinary practice [Dostizheniya molodykh uchennykh – v veterinarnuyu praktiku]: Materials of the V International Scientific Conference (Vladimir, December 5–6, 2019)*. Under general editorship of D. A. Lozovoy. Vladimir: FGBI "ARRIAH"; 2019; 57–62. eLIBRARY ID: 41589695. (in Russian)
- Reddel R. R., Bryan T. M., Murnane J. P. Immortalized cells with no detectable telomerase activity. *Biochemistry (Moscow)*. 1997; 62 (11): 1467–1476. Available at: <http://journals.belozersky.msu.ru/biochemistry/paper/1997/11/1467>. (in Russian)

Поступила 29.05.2020

Принята в печать 02.07.2020

Received on 29.05.2020

Approved for publication on 02.07.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Манин Борис Леонидович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник сектора культуры клеток отдела инноваций ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Вологина Ирина Викторовна, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник сектора культуры клеток отдела инноваций ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Трофимова Елена Александровна, ведущий технолог сектора культуры клеток ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Boris L. Manin, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Sector for Cell Culture, Innovation Department, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Irina V. Vologina, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Sector for Cell Culture, Innovation Department, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Elena A. Trofimova, Leading Technologist, Sector for Cell Culture, Innovation Department, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-304-312
УДК 619:578.835.2:615.371.004.12:616-076

Определение концентрации 146S частиц вируса ящура спектрометрическим способом при оценке количества вирусной РНК

М. И. Доронин¹, Д. В. Михалишин², В. А. Стариков³, Д. А. Лозовой⁴, Ю. С. Елькина⁵, А. В. Борисов⁶

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ ORCID 0000-0002-4682-6559, e-mail: doronin@arriah.ru

² ORCID 0000-0003-1718-1955, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

³ ORCID 0000-0002-9960-0887, e-mail: starikov@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0002-5983-7062

⁵ ORCID 0000-0002-2986-8992, e-mail: elkina_ys@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0001-9880-9657, e-mail: borisov_av@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В процессе промышленного производства противоящурных вакцин особое внимание уделяют концентрации 146S частиц, которые наделены важнейшими биологическими свойствами вируса ящура и являются основными компонентами, влияющими на иммуногенную активность вакцинных препаратов. По этой причине каждую серию вакцинного сырья исследуют на определение концентрации 146S компонента. В статье представлены результаты изучения применения спектрометрического метода для определения концентрации полных частиц при оценке количества РНК вируса ящура, выделенной после иммунного захвата. Данный способ является дешевым, простым в исполнении, позволяет определять концентрацию 146S частиц вируса ящура в неинaktivированной культуральной суспензии. Выявлено существование зависимости между концентрацией 146S частиц и количеством молекул РНК, выделенных из вирионов после их штаммоспецифического иммунного захвата и количественно детектированных спектрометрическим методом. Представленный метод позволяет определять значение концентрации 146S компонента вируса ящура в неинaktivированном сырье для вакцины с применением предложенной линейной модели. Корреляция спектрометрического способа с полимеразной цепной реакцией с обратной транскрипцией в режиме реального времени и реакцией связывания комплемента при тестировании 360 неинaktivированных суспензий вируса ящура всех типов составила 94,5–99,5%. Для положительного контроля совпадение фактических и ожидаемых результатов соответствовало 99,0–99,6%. В отрицательном контрольном образце геном и 146S частицы вируса ящура не обнаружены, что соответствовало ожиданиям.

Ключевые слова: РНК вируса ящура, концентрация 146S компонента, спектрометрический анализ, иммунный захват.

Благодарность: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Доронин М. И., Михалишин Д. В., Стариков В. А., Лозовой Д. А., Елькина Ю. С., Борисов А. В. Определение концентрации 146S частиц вируса ящура спектрометрическим способом при оценке количества вирусной РНК. *Ветеринария сегодня*. 2020; 4 (35): 304–312. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-304-312.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Доронин Максим Игоревич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: doronin@arriah.ru.

UDC 619:578.835.2:615.371.004.12:616-076

Determination of FMDV 146S particle concentration by spectrometric method during viral RNA quantification

M. I. Doronin¹, D. V. Mikhilishin², V. A. Starikov³, D. A. Lozovoy⁴, Yu. S. El'kina⁵, A. V. Borisov⁶

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ ORCID 0000-0002-4682-6559, e-mail: doronin@arriah.ru

² ORCID 0000-0003-1718-1955, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

³ ORCID 0000-0002-9960-0887, e-mail: starikov@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0002-5983-7062

⁵ ORCID 0000-0002-2986-8992, e-mail: elkina_ys@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0001-9880-9657, e-mail: borisov_av@arriah.ru

SUMMARY

During FMD vaccine production, special attention is paid to the concentration of 146S particles bearing the critical biological features of FMDV and being the main components that have an effect on vaccine immunogenicity. For this reason, each batch of vaccine raw material is tested for 146S component concentration. The paper presents the results of the use of a spectrometric method for whole particle concentration determination during quantification of FMDV RNA extracted after immune capture. It is an inexpensive, easy-to-perform method allowing for determination of FMDV 146S particle concentration in the non-inactivated culture suspension. 146S particle concentration was found to depend on the number of RNA molecules extracted from virions after their strain-specific immune capture and quantitatively detected by the spectrometric method. The presented method allows for determination of 146S component concentration in the non-inactivated vaccine raw material using the proposed linear model. The spectrometric method showed 94.5–99.5% correlation with real time reverse transcription polymerase chain reaction and complement fixation test based on the results of tests of 360 non-inactivated suspensions of FMDV of all types. Tests of the positive control demonstrated 99.0–99.6% compatibility of actual and expected results. FMDV genome and 146S particles were not detected in the negative control, and that was in line with expectations.

Key words: FMDV RNA, 146S component concentration, spectrometric analysis, immune capture.

Acknowledgements: The study was funded by the FGBI "ARRIAH" within the framework of "Veterinary Welfare" research work.

For citation: Doronin M. I., Mikhailishin D. V., Starikov V. A., Lozovoy D. A., El'kina Yu. S., Borisov A. V. Determination of FMDV 146S particle concentration by spectrometric method during viral RNA quantification. *Veterinary Science Today*. 2020; 4 (35): 304–312. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-304-312.

Conflict of interests: The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Maksim I. Doronin, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: doronin@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Ящур – острое высококонтагиозное вирусное заболевание, сопровождающееся лихорадкой, которому подвержены дикие и домашние парнокопытные животные [1]. Возбудителем является РНК-содержащий вирус, принадлежащий к порядку *Picornavirales*, семейству *Picornaviridae*, роду *Aphthovirus*. Вирус ящура характеризуется высокой антигенной изменчивостью за счет мутаций в генах капсидных белков, представлен типами А, О, С, Азия-1, CAT-1, CAT-2, CAT-3 и множеством генетических линий [2].

Вирион вируса ящура имеет диаметр около 23–25 нм. Геном представляет собой одноцепочечную позитивную РНК, состоящую приблизительно из 8500 н. о. Молекулярный вес вириона составляет около 8 080 000 Да [3]. При репродукции в чувствительных клеточных линиях вирус ящура формирует 4 варианта компонентов: 146S частицы (вирионы), состоящие из одной молекулы вирусной РНК и 60 копий полипептида, каждая из которых представлена комплексом белков VP_1 - VP_2 - VP_3 - VP_4 ; 75S компонент, лишенный РНК и включающий в себя 60 копий полипептида VP_1 - VP_3 - VP_4 ; 12S частицы, представленные белками VP_1 , VP_2 , VP_3 ; 3,8S субъединицы, состоящие из неструктурного белка VP_9 [4].

Система мер борьбы и профилактики заболевания предусматривает массовую иммунизацию крупного и мелкого рогатого скота, а также контроль уровня напряженности поствакцинального иммунитета [1, 5]. В процессе промышленного производства противоящурных вакцин особое внимание уделяют концентрации 146S частиц, которые являются носителями основных биологических свойств вируса ящура и основными компонентами, влияющими на иммуногенную активность вакцинных препаратов [4]. Для определения концентрации 146S компонентов в вакцинном сырье каждой серии используют количественный вариант

реакции связывания комплемента (РСК) и полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ). Первый метод имеет ряд недостатков: трудоемкость и продолжительность проводимого анализа (до 3 сут), невозможность одновременного исследования большого количества проб, достаточно высокая себестоимость [6]. Метод ОТ-ПЦР-РВ позволяет ускорить проведение анализа до 4 ч, однако требует дорогостоящего оборудования и реактивов [7]. Кроме того, при наличии в пробе избыточного количества балластных компонентов степень достоверности точного определения концентрации 146S иммуногенного компонента может снижаться за счет явления антикомплемментарности в РСК и высокой нагрузки сорбента балластным белком на этапе выделения РНК.

В связи с этим целесообразно провести поиск способа определения количества 146S компонента вируса ящура в неинaktivированном сырье для вакцины на основе альтернативного метода.

Цель работы – определить возможность применения спектрометрического способа для определения концентрации 146S частиц при оценке количества РНК вируса ящура.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус. В работе использовали неинaktivированные суспензии культурального вируса ящура вакцинных штаммов А/Турция/2006, А/ВНИИЗЖ/2015, О/Приморский/2012, О/Приморский/2014, Азия-1/Таджикистан/2011, С₁/Закарпатский/1972, CAT-1/Ахалкалакский/62, CAT-2/Саудовская Аравия 7/2000, CAT-3/Бечуаналенд 1/65, которые депонированы в коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ». Репродукцию вируса осуществляли в перевиваемой суспензионной культуре клеток почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21).

Сенсибилизация иммунологического планшета. Сенсибилизацию 24-луночного планшета, поверхность которого свободна от ДНК и РНК, ДНКаз и РНКаз, проводили штаммоспецифическими поликлональными антителами против вируса ящура в объеме $1,0 \text{ см}^3$ с концентрацией иммуноглобулинов G в суспензии $5,0 \text{ мкг/см}^3$ при температуре $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 18 ч. Открытые сайты связывания блокировали 0,5%-й суспензией бычьего сывороточного альбумина при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 1 ч. Данный процесс является подготовительным, его проводят заранее, до начала анализа.

Иммунный захват вирионов вируса ящура. В лунки с нанесенными антителами против вирионов определенного штамма вируса ящура вносили по $3,0 \text{ см}^3$ вирусной суспензии и инкубировали при температуре 37°C в течение 1 ч. Формировались иммунные комплексы, одни из которых были вида «146S частица – штаммоспецифические антитела». Из лунок удаляли суспензию, не затрагивая поверхностный слой на дне планшета. Затем в лунки добавляли по $1,0 \text{ см}^3$ 1/15 М фосфатно-солевого буферного раствора и проводили ресуспендирование.

Выделение РНК из 146S частиц вируса ящура. К $1,0 \text{ см}^3$ суспензии иммунного комплекса «146S частица – антитела» добавляли 10 мл раствора, содержащего 50% фенола (рН < 7,0) и 50% 4 М гуанидин изотиоцианата (ГТЦ), и инкубировали 20 мин при температуре $23\text{--}25^\circ\text{C}$. Полученный лизат центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 8 мин.

Надосадок переносили в центрифужную пробирку, добавляли $2,5 \text{ см}^3$ хлороформа и инкубировали содержимое в течение 4 мин с периодическим перемешиванием. После экспозиции смесь центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 12 мин при температуре $4\text{--}5^\circ\text{C}$. В результате осаждения происходило фракционирование содержимого пробирки на три фазы: 1) нижнюю фазу соломенного цвета, содержащую комплекс фенола и хлороформа со связанными липидами и полипептидами; 2) среднюю фазу белого цвета, включающую в свой состав пептидные составляющие и ДНК; 3) верхнюю фазу, представляющую собой прозрачный экстракт РНК [8, 9]. В пустую пробирку полностью отбирали верхнюю фазу, не затрагивая остальные фракции, и добавляли $4,5 \text{ см}^3$ 100%-го изопропилового спирта. Полученную смесь инкубировали в течение 8 мин при температуре $23\text{--}25^\circ\text{C}$, затем содержимое пробирки центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 8 мин при температуре $23\text{--}25^\circ\text{C}$. Супернатант удаляли, оставляя полученный осадок РНК вируса ящура. К осажденной РНК добавляли $2,0 \text{ см}^3$ 80%-го этилового спирта. Содержимое перемешивали и осаждали при 14 000 об/мин в течение 6 мин при температуре $23\text{--}25^\circ\text{C}$. Удаляли супернатант, а осадок РНК высушивали в потоке воздуха комнатной температуры в течение 5 мин. К РНК добавляли $0,1 \text{ см}^3$ буфера TE (10 мМ трис(оксиметил)аминометан, 1 мМ этилендиаминтетрауксусная кислота, рН 7,0–7,2), свободного от РНКаз и катионов Mg^{2+} , прогревали содержимое при $55\text{--}60^\circ\text{C}$ в течение 2–3 мин для максимального

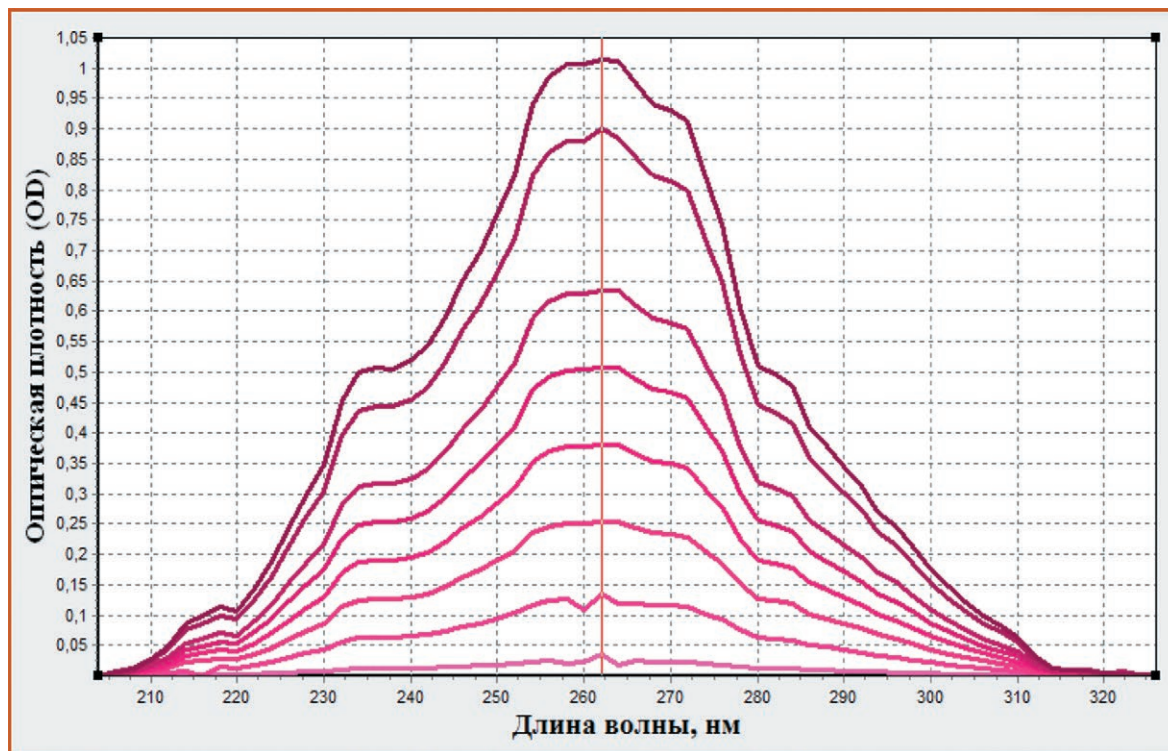


Рис. 1. Спектрограммы разведений стандартного элюата РНК вируса ящура штамма Азия-1/Таджикистан/2011. Сверху вниз отражены графики для некоторых разведений элюатов, соответствующих концентрациям 146S частиц: 4,0; 3,5; 3,0; 2,5; 2,0; 1,5; 1,0; 0,5; 0,1 мкг/см^3 ($n = 3$)

Fig. 1. Spectrograms of dilutions of standard FMDV Asia-1/Tajikistan/2011 strain RNA eluate. The figure shows (from top downwards) graphs for some dilutions of eluates corresponding to the following 146S particle concentrations: 4.0; 3.5; 3.0; 2.5; 2.0; 1.5; 1.0; 0.5; 0.1 $\mu\text{g/cm}^3$ ($n = 3$)

растворения РНК вируса ящура. Получали 30-кратные элюаты РНК вируса ящура стандартных разведений и отрицательного контроля 146S частиц.

Оценка степени чистоты элюата РНК вируса ящура с помощью спектрального анализа. Измерение спектральной поглощающей способности элюатов РНК вируса ящура проводили при длинах волн в диапазоне 205–325 нм. В указанном спектре оценивали содержание в препарате остатков фосфолипидов, полисахаридов и гуанидин изотиоцианата, фенола, полипептидов, крупных конгломератов, определяя значения оптической плотности (OD) при 205, 235, 270, 280 и 320 нм соответственно [10, 11]. Элюат РНК считали свободным от примесей белка и фенола, если коэффициент экстинкции R_1 (OD_{262}/OD_{280}) находился в пределах 1,8–2,2 и его значение приближалось к 2,0. Экстракт РНК вируса ящура считали незагрязненным полисахаридами, если коэффициент экстинкции R_2 (OD_{262}/OD_{235}) соответствовал значению 2,00–2,02 [12]. При замещении 1% РНК на полисахаридные составляющие значение R_2 уменьшается на 0,002. При $R_2 > 2,02$ отмечали диссоциирование нуклеиновой кислоты и наличие нуклеотидов в элюате. Если OD_{320} стремилась к нулевому значению, это указывало на отсутствие взвеси крупных частиц в экстракте [8].

Реакция связывания комплемента (РСК). Для определения концентрации 146S частиц вируса ящура применяли количественный вариант РСК, проведение которого осуществляли в соответствии с требованиями [6].

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ). Индикацию и количественный анализ генома вируса ящура в неинaktivированном материале для вакцины проводили методом ОТ-ПЦР-РВ. Количество компонентов для реакции, а также временные и температурные параметры термоциклирования указаны в требованиях, описанных ранее [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы исследовали положительный стандарт, в качестве которого использовали неинaktivированную суспензию культурального вируса ящура штамма Азия-1/Таджикистан/2011 с концентрацией 146S частиц ($4,00 \pm 0,11$) мкг/см³ (по данным РСК и ОТ-ПЦР-РВ). Проводили иммунный захват вирионов вируса ящура с применением иммунологического планшета, который был сенсibilизирован поликлональными антителами, специфичными к полному частицам вируса указанного штамма. Отрицательным контрольным образцом служила суспензия клеточной линии ВНК-21 с концентрацией клеток ($3,00 \pm 0,10$) млн/см³, не инфицированных вирусом ящура. По итогам серологической реакции получили суспензию связанных с помощью штаммоспецифических иммуноглобулинов G 146S частиц вируса ящура. Данную суспензию использовали для выделения РНК из полных вирусных частиц и в результате получили 30-кратный экстракт РНК вируса ящура штамма Азия-1/Таджикистан/2011 в количестве 0,1 см³.

На следующем этапе исследования проводили оценку степени чистоты элюата РНК вируса ящура штамма Азия-1/Таджикистан/2011 положительного стандарта с помощью спектрального анализа в излучении ультрафиолетового света. Регистрировали значения экстинкции образца в диапазоне от 205 до 325 нм

каждые 2 нм и осуществляли полную запись спектра поглощения РНК с помощью программного обеспечения Spectrum v. 5.0 (рис. 1).

Полученные результаты анализа 30-кратного препарата показали, что значения $OD_{205-259}$ и $OD_{263-325}$ не превышали $OD_{260-262}$ ($0,001-1,006 < 1,007-1,014$ и $1,013-0,004 < 1,007-1,014$), что является признаком высокой степени чистоты полученного элюата РНК. При проведении спектрального исследования стандарта наблюдали отсутствие выраженных пиков на графике при длинах волн 205, 235, 270, 280 и 320 нм, что свидетельствовало о практически полном отсутствии загрязнения препарата примесями фосфолипидов, полисахаридов и остатков ГТЦ, фенола, полипептидов и крупных конгломератов соответственно. При этом коэффициент экстинкции R_1 составлял 1,988 ($OD_{262}/OD_{280} = 1,014/0,510$), что приближалось к норме 2,000 и подтверждало отсутствие ДНК и наличие лишь следовых количеств примесей белка. Дегградации нуклеиновой кислоты и наличия свободных нуклеотидов в растворе не наблюдалось, поскольку R_1 не превышал 2,000. Элюат РНК вируса ящура положительного стандарта не был загрязнен полисахаридами и ГТЦ, так как коэффициент экстинкции R_2 ($OD_{262}/OD_{235} = 1,014/0,506$) соответствовал значению 2,004. Учитывая, что при замещении 1% РНК на полисахаридные составляющие значение R_2 уменьшается на 0,002, в полученном элюате наличие примесей углеводов выявлено не было.

На следующем этапе исследования проводили определение количества молекул РНК, экстрагированных из 146S частиц вируса ящура. Максимальный уровень поглощения одноцепочечных РНК отмечают при длинах волн 252–271 нм, что объясняется высокой спектральной поглощающей способностью рибонуклеозид-5'-трифосфатов в данном диапазоне, а именно: для аденозин-5'-трифосфата (λ_{ATP}) – 259 нм, уридин-5'-трифосфата (λ_{UTP}) – 262 нм, гуанозин-5'-трифосфата (λ_{GTP}) – 252 нм, цитидин-5'-трифосфата (λ_{CTP}) – 271 нм [13]. Спектральные исследования доказывают, что поглощения мономеров цельных РНК сливаются,

Таблица 1

Процентное содержание рибонуклеозид-5'-трифосфатов и длины волн с максимальным поглощением РНК вируса ящура разных типов

Table 1
Ribonucleoside-5'-triphosphate percentages
and maximum absorption wavelengths for RNAs of different FMDV types

Тип вируса ящура	Среднее значение доли рибонуклеозид-5'-трифосфатов в геноме вируса ящура (И), %				Длина волны с максимальным поглощением для РНК, нм	
	ATP	UTP	GTP	CTP	расчетная	эмпирическая
A	25,1	20,9	25,7	28,3	261,64	262
O	25,6	21,4	25,9	27,1	261,51	262
C	25,1	21,2	25,4	28,3	261,68	262
Азия-1	24,7	21,2	25,9	28,2	261,63	262
CAT-1	25,2	20,9	25,1	28,7	261,74	262
CAT-2	25,4	21,0	25,3	28,6	261,70	262
CAT-3	25,3	20,9	24,9	28,9	261,77	262

Таблица 2

Зависимость между концентрацией 146S частиц и 30-кратным количеством молекул РНК, выделенных из полных частиц вируса ящура ($n = 3, p < 0,005$)

Table 2

Relationship between 146S particle concentration and 30-fold number of RNA molecules extracted from whole particles of FMDV ($n = 3, p < 0.005$)

Тип контрольного образца	Концентрация 146S частиц, мкг/мл	Среднее количество молекул РНК, выделенных из 146S частиц вируса ящура, в 30-кратном элюате		
		теоретическое значение	по данным спектрометрического метода	степень достоверности, %
положительный стандарт	0,1	7 457 680 118	7 315 278 733	98,05
	0,2	14 915 360 236	14 349 200 591	96,05
	0,3	22 373 040 353	21 383 122 450	95,37
	0,4	29 830 720 471	28 698 401 183	96,05
	0,5	37 288 400 589	36 013 679 916	96,46
	0,6	44 746 080 707	43 328 958 649	96,73
	0,7	52 203 760 825	49 800 166 759	95,17
	0,8	59 661 440 943	57 115 445 492	95,54
	0,9	67 119 121 060	66 118 865 471	98,49
	1,0	74 576 801 178	73 715 501 078	98,83
	1,1	82 034 481 296	79 061 281 690	96,24
	1,2	89 492 161 414	88 346 058 544	98,70
	1,3	96 949 841 532	95 379 980 402	98,35
	1,4	104 407 521 649	100 163 047 266	95,76
	1,5	111 865 201 767	109 166 467 245	97,53
	1,6	119 322 881 885	114 512 247 858	95,80
	1,7	126 780 562 003	122 952 954 088	96,89
	1,8	134 238 242 121	130 830 946 570	97,40
	1,9	141 695 922 239	137 302 154 679	96,80
	2,0	149 153 602 356	147 712 359 030	99,02
	2,1	156 611 282 474	153 620 853 391	98,05
	2,2	164 068 962 592	158 403 920 255	96,42
	2,3	171 526 642 710	164 875 128 365	95,97
	2,4	178 984 322 828	170 502 265 852	95,03
	2,5	186 442 002 946	180 349 756 454	96,62
	2,6	193 899 683 063	190 197 247 056	98,05
	2,7	201 357 363 181	196 949 812 040	97,76
	2,8	208 815 043 299	203 421 020 150	97,35
	2,9	216 272 723 417	211 580 369 506	97,78
	3,0	223 730 403 535	221 146 503 234	98,83
	3,1	231 188 083 652	224 522 785 726	97,03
	3,2	238 645 763 770	228 743 138 841	95,67
	3,3	246 103 443 888	237 465 201 946	96,36
	3,4	253 561 124 006	245 061 837 553	96,53
	3,5	261 018 804 124	255 190 685 029	97,72
	3,6	268 476 484 242	261 943 250 013	97,51
	3,7	275 934 164 359	265 038 175 631	95,89
	3,8	283 391 844 477	271 790 740 615	95,73
	3,9	290 849 524 595	284 451 799 961	97,75
	4,0	298 307 204 713	287 546 725 579	96,26
отрицательный контроль	0,0	0	не обнаружено	–

обеспечивая максимальную экстинкцию в указанном диапазоне длин волн [14]. При проведении эксперимента был проведен нуклеотидный анализ РНК широкого спектра изолятов и штаммов 7 типов вируса ящура, представленных в архивной базе данных GenBank [3]. По результатам исследования были определены средние процентные соотношения рибонуклеозид-5'-трифосфатов ($W_{ATP}, W_{UTP}, W_{GTP}, W_{CTP}$) в составе генома. Результаты исследования отражены в таблице 1.

Полученные данные позволили рассчитать средние значения длин волн с максимальным уровнем поглощения (λ_{max}) РНК для каждого типа возбудителя ящура, пользуясь формулой: $\lambda_{max} = \lambda_{ATP} \times W_{ATP} + \lambda_{UTP} \times W_{UTP} + \lambda_{GTP} \times W_{GTP} + \lambda_{CTP} \times W_{CTP}$. Так, определено, что для генома штаммов вируса ящура типа А λ_{max} составляет 261,64 нм, О – 261,51 нм, С – 261,68 нм, Азия-1 – 261,63 нм, CAT-1 – 261,74 нм, CAT-2 – 261,70 нм, CAT-3 – 261,77 нм. Значения λ_{max} были получены экспериментально биоспектрометрическими исследованиями элюатов РНК вируса ящура всех типов и оказались приближены к эмпирическим значениям – 262 нм (табл. 1).

Количество молекул одноцепочечной РНК в чистом препарате рассчитывали, пользуясь законом Бугера – Ламберта – Бера, в соответствии с которым отмечается ослабление параллельного монохроматического пучка света при прохождении через поглощающую среду [10]. На основании данного закона возможно найти соотношение концентрации частиц, поглощающих излучение, и количества поглощенного света. При $\lambda = 260$ –262 нм средний коэффициент экстинкции для одноцепочечной РНК составляет $0,024 \text{ (мкг/см}^3\text{)}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Исходя из этого, раствор с содержанием нуклеиновой кислоты $1,00 \text{ мкг/см}^3$ при прохождении ультрафиолетового света с длиной волны 260 нм имеет значение OD_{260} , соответствующее 24,000, и, как следствие, оптическая плотность, равная 1,000, соответствует элюату, содержащему $41,67 \text{ мкг РНК/см}^3$ [13]. В случае с нуклеиновой кислотой вируса ящура в результате измерений выявили, что максимальное поглощение РНК наблюдается при $\lambda = 262 \text{ нм}$, при этом для высокоочищенного экстракта с содержанием РНК $41,67 \text{ мкг/см}^3$ значение OD_{262} составляет 1,000.

Применение закона Бугера – Ламберта – Бера справедливо для определения числа молекул вирусной РНК в разбавленных элюатах, поскольку при высоких концентрациях аналита ($> 1,00 \text{ мкг/см}^3$) расстояние между молекулами поглощающего ультрафиолетовый свет вещества значительно снижается. В результате увеличивается влияние каждой частицы на распределение поверхностного заряда между соседними молекулами, что может изменить способность РНК поглощать излучение при указанной длине волны. Таким образом, для определения количества молекул РНК вируса ящура в препаратах с высокой концентрацией требуется готовить разведения аналита с использованием буфера ТЕ. До измерения абсорбции разведения элюата необходимо проводить автоматическое вычитание фоновых значений буфера ТЕ. Для расчета содержания РНК 146S частиц в препарате требуется учитывать фактор пересчета для нуклеиновой кислоты возбудителя ящура ($F_{РНК\text{ящ}} = 41,67$), кратность разведения (K), а также вычитать фоновое значение проб (OD_{320}) и отрицательного контроля ($OD_{260\text{К}}$) из OD_{262} . При определении количества молекул РНК вируса ящура (НРНК_{ящ}) учитывают число Авогадро ($6,022045 \times 10^{23} \text{ моль}^{-1}$), средний молекулярный вес рибонуклеозида ($Mw_{\text{рибонуклеозида}} = 340,5 \text{ Да}$),

длину РНК вируса ящура ($L = 8500$ н. о.) [13], а также производят перевод массы нуклеиновой кислоты из [мкг] в [г] в соответствии с требованиями Международной системы единиц Le Systeme International d'Unites [11] (коэффициент $1/10^6$) и пересчет количества молекул из 30-кратного элюата в однократный раствор (коэффициент $1/10^{1,48}$) (общий коэффициент пересчета составляет $1/10^{7,48}$).

При репродукции вируса ящура в чувствительных клеточных линиях происходит формирование 146S частиц (вирионов), каждая из которых включает в свой состав одну молекулу РНК. Необходимо отметить, что в суспензиях вируса ящура РНК находится не только в составе вирионов (98–99%), но и в незначительном количестве (1–2%) в свободном состоянии по итогам процесса репродукции [4, 15]. Иными словами, при расчете количества РНК, выделенных из полных частиц, следует учитывать коэффициент 0,98.

Количество молекул РНК, экстрагированных из 146S частиц вируса ящура ($N_{\text{РНК } 146S}$), с учетом указанных выше параметров предложено определять с использованием расчетной формулы:

$$N_{\text{РНК } 146S} = 0,98 \times \frac{41,67 \times K \times (OD_{262} - OD_{320} - OD_{260K}) \times N_A}{10^{7,48} \times Mw_{\text{рибонуклеозида}} \times L},$$

где K – кратность разведения элюата РНК, выделенной из 146S частиц вируса ящура;

OD_{262} – значение оптической плотности элюата РНК, выделенной из 146S частиц вируса ящура, при длине волны 262 нм;

OD_{320} – значение оптической плотности экстракта РНК, выделенной из 146S частиц вируса ящура, при длине волны 320 нм;

OD_{260K} – значение оптической плотности отрицательного контроля при длине волны 260 нм;

N_A – постоянная Авогадро ($6,022045 \times 10^{23}$ моль $^{-1}$);

$Mw_{\text{рибонуклеозида}}$ – средний молекулярный вес рибонуклеозида (340,5 Да);

L – длина генома вируса ящура (8500 н. о.);

41,67 – фактор РНК вируса ящура ($F_{\text{РНКВЯ}}$);

$1/10^{7,48}$ – суммарный коэффициент перевода массы из [мкг] в [г] и пересчета количества молекул РНК вируса ящура из 30-кратного элюата в однократный раствор.

На следующем этапе исследования проводили поиск модели определения концентрации 146S частиц вируса ящура по количеству молекул выделенной вирусной РНК. Для выявления зависимости концентрации 146S частиц вируса ящура от количества молекул вирусной РНК составляли серию разведений 30-кратного стандарта РНК, экстрагированной из суспензии вируса ящура штамма Азия-1/Таджикистан/2011 с содержанием полных частиц $4,0$ мкг/см 3 , получая стандартные образцы нуклеиновой кислоты, соответствующие концентрациям 146S частиц от $0,1$ до $4,0$ мкг/см 3 с шагом $0,1$ мкг/см 3 . До измерения абсорбции полученных стандартных образцов осуществляли автоматическое вычитание фоновых значений буфера ТЕ. Проводили спектральный анализ приготовленных положительных стандартов, определяя значения экстинкции при длинах волны 262 и 320 нм. Оптическую плотность отрицательного контроля измеряли для выявления наличия неспецифических молекул РНК, максимальное поглощение для которых отмечалось при $\lambda = 260$ нм. Спектральный анализ некоторых из указан-

ных стандартов представлен на рисунке 1. Результаты измерений и расчета количеств молекул РНК, выделенных из 146S частиц, отражены в таблице 2, из которой видно, что значения $N_{\text{РНК } 146S}$ для всех разведений 30-кратного стандарта с количеством 146S частиц от $0,1$ до $4,0$ мкг/см 3 находились в диапазоне от $7\,315\,278\,733$ до $287\,546\,725\,579$ соответственно.

Известно, что полные частицы вируса ящура включают в свой состав одну молекулу РНК, при этом содержание свободной РНК в вирусных суспензиях незначительно [4], откуда следует, что существует прямая зависимость количества 146S частиц и числа молекул РНК вируса ящура при расчетах в одинаковом объеме неинaktivированной суспензии после репродукции возбудителя. Известно, что для вируса ящура молекулярная масса цельных вирионов (Mw_{146S}) в среднем составляет $8\,080\,000$ – $8\,167\,500$ Да [3, 4, 15]. Учитывая, что геном вируса имеет длину около 8500 н. о. [3, 4] и средний молекулярный вес рибонуклеозида равен $340,5$ Да, молекулярная масса вирусной РНК ($Mw_{\text{РНКВЯ}}$) составляет около $2\,894\,250$ Да, что в среднем в $2,79$ – $2,82$ раза меньше по сравнению с Mw_{146S} . Иными словами, теоретически концентрация 146S частиц (мкг/см 3) в суспензиях вируса ящура в среднем в $2,79$ – $2,82$ раза выше, чем концентрация вирусной РНК (мкг/см 3), откуда следует,

$$\text{что } \frac{m_{146S}}{m_{\text{РНК } 146S}} = 2,79 \div 2,82, \text{ или } m_{\text{РНК } 146S} = \frac{m_{146S}}{2,79 \div 2,82}.$$

Данное выражение подставляем в отношение $\frac{m_{146S}}{N_{\text{РНК } 146S}}$ вместо $m_{\text{РНК } 146S}$, учитывая, что

$$N_{\text{РНК } 146S} = \frac{m_{\text{РНК}} \times N_A}{10^6 \times L \times Mw_{\text{рибонуклеозида}}},$$

где $m_{\text{РНК}}$ – масса РНК вируса ящура;

N_A – постоянная Авогадро ($6,022045 \times 10^{23}$ моль $^{-1}$);

L – длина генома вируса ящура (8500 н. о.);

$Mw_{\text{рибонуклеозида}}$ – средний молекулярный вес рибонуклеозида ($340,5$ Да);

$1/10^6$ – коэффициент перевода массы из [мкг] в [г].

В результате преобразований получаем, что

$$\frac{N_{\text{РНК } 146S}}{m_{146S}} = 7,38 \times 10^{10} - 7,46 \times 10^{10}.$$

Это означает, что теоретически число молекул РНК 146S в среднем в $7,38 \times 10^{10}$ – $7,46 \times 10^{10}$ больше концентрации 146S частиц, что было подтверждено экспериментально при проведении анализа разведений стандартов с известными концентрациями 146S частиц с помощью предложенного способа. Полученные результаты анализа отражены в таблицах 2 и 3.

Как следует из данных таблицы 2, степень достоверности определения количества молекул РНК, выделенных из суспензий вируса ящура с концентрациями 146S частиц от $0,1$ до $4,0$ мкг/см 3 , находилась в диапазоне от $95,03$ до $99,02\%$.

На основе полученных данных о количестве молекул вирусной РНК в разведениях стандарта и концентрации соответствующих им 146S частиц был построен калибровочный график зависимости C_{146S} и $N_{\text{РНК } 146S}$, который представлен в виде модели

$$C_{146S} = \frac{3,9 \times N_{\text{РНК } 146S} + 566\,783\,689}{280\,818\,944\,837}$$

с достоверностью аппроксимации $R^2 = 0,9996$ (рис. 2). В отрицательном контроле вирус ящура не обнаружен.

Таблица 3

Зависимость между концентрацией 146S частиц и количеством молекул РНК, выделенных из полных частиц вируса ящура штамма Азия-1/Таджикистан/2011 ($n = 3, p < 0,005$)

Table 3

Relationship between 146S particle concentration and the number of RNA molecules extracted from whole particles of FMDV Asia-1/Tajikistan/2011 strain ($n = 3, p < 0.005$)

Концентрация 146S частиц в стандарте, мкг/мл	Средние значения оптической плотности			Расчетное количество молекул РНК _{146S}
	стандартных образцов		отрицательного контроля	
	OD ₂₆₂	OD ₃₂₀ [*]		
0,1	0,026 ± 0,001	0,002	0,006	7 315 278 733
0,2	0,051 ± 0,001	0,000	0,006	14 349 200 591
0,3	0,076 ± 0,001	0,001	0,006	21 383 122 450
0,4	0,102 ± 0,001	0,002	0,006	28 698 401 183
0,5	0,128 ± 0,001	0,001	0,006	36 013 679 916
0,6	0,154	0,002	0,006	43 328 958 649
0,7	0,177 ± 0,001	0,001	0,006	49 800 166 759
0,8	0,203	0,003	0,006	57 115 445 492
0,9	0,235 ± 0,001	0,002	0,006	66 118 865 471
1,0	0,262 ± 0,001	0,003	0,006	73 715 501 078
1,1	0,281 ± 0,001	0,004	0,006	79 061 281 690
1,2	0,314 ± 0,001	0,003	0,006	88 346 058 544
1,3	0,339 ± 0,001	0,003	0,006	95 379 980 402
1,4	0,356 ± 0,001	0,005	0,006	100 163 047 266
1,5	0,388	0,004	0,006	109 166 467 245
1,6	0,407	0,005	0,006	114 512 247 858
1,7	0,437 ± 0,001	0,006	0,006	122 952 954 088
1,8	0,465 ± 0,001	0,006	0,006	130 830 946 570
1,9	0,488 ± 0,001	0,004	0,006	137 302 154 679
2,0	0,525 ± 0,001	0,007	0,006	147 712 359 030
2,1	0,546 ± 0,001	0,005	0,006	153 620 853 391
2,2	0,563	0,005	0,006	158 403 920 255
2,3	0,586 ± 0,001	0,007	0,006	164 875 128 365
2,4	0,606 ± 0,001	0,005	0,006	170 502 265 852
2,5	0,641 ± 0,001	0,008	0,006	180 349 756 454
2,6	0,676 ± 0,001	0,006	0,006	190 197 247 056
2,7	0,700	0,002	0,006	196 949 812 040
2,8	0,723 ± 0,001	0,002	0,006	203 421 020 150
2,9	0,752 ± 0,002	0,003	0,006	211 580 369 506
3,0	0,786 ± 0,001	0,004	0,006	221 146 503 234
3,1	0,798 ± 0,002	0,001	0,006	224 522 785 726
3,2	0,813 ± 0,001	0,005	0,006	228 743 138 841
3,3	0,844 ± 0,001	0,001	0,006	237 465 201 946
3,4	0,871 ± 0,002	0,003	0,006	245 061 837 553
3,5	0,907 ± 0,001	0,001	0,006	255 190 685 029
3,6	0,931 ± 0,002	0,002	0,006	261 943 250 013
3,7	0,942 ± 0,001	0,002	0,006	265 038 175 631
3,8	0,966 ± 0,001	0,002	0,006	271 790 740 615
3,9	1,011 ± 0,002	0,003	0,006	284 451 799 961
4,0	1,024 ± 0,002	0,002	0,006	287 546 725 579

OD₂₆₂ — значение экстинкции при 262 нм; OD₃₂₀ — значение экстинкции при 320 нм;

OD_{260 К.} — значение экстинкции для отрицательного контроля при 260 нм;

* значения при измерениях не менялись.

OD₂₆₂ — extinction value at 262 nm; OD₃₂₀ — extinction value at 320 nm;

OD_{260 К.} — extinction value for the negative control at 260 nm;

* values remained unchanged when measured.

Полученная модель на основе количества молекул РНК вируса ящура, выделенной из 146S частиц после иммунного захвата вирионов, позволяет определять концентрацию цельных частиц в культуральных неинактивированных вирусных суспензиях.

На заключительном этапе исследования проводили тестирование представленного способа определения концентрации 146S частиц в 360 неинактивированных суспензиях вируса ящура вакцинных штаммов А/Турция/2006 (40 проб), А/ВНИИЗЖ/2015 (40 проб), О/Приморский/2012 (40 проб), О/Приморский/2014 (40 проб), Азия-1/Таджикистан/2011 (40 проб), С₁/Закарпатский/1972 (40 проб), САТ-1/Ахалкалакский/62 (40 проб), САТ-2/Саудовская Аравия 7/2000 (40 проб), САТ-3/Бечуаналенд 1/65 (40 проб). Исследования параллельно проводили методами ОТ-ПЦР-РВ и РСК в трех повторениях (табл. 4).

Совпадение фактических и ожидаемых (по данным ОТ-ПЦР-РВ и РСК) результатов определения концентрации 146S компонента культурального вируса ящура для штамма А/Турция/2006 составило 96,2–99,4%, для А/ВНИИЗЖ/2015 – 94,9–99,3%, для О/Приморский/2012 – 97,2–99,2%, для О/Приморский/2014 – 97,0–99,3%, для Азия-1/Таджикистан/2011 – 97,6–99,5%, для С₁/Закарпатский/1972 – 95,2–97,7%, для САТ-1/Ахалкалакский/62 – 94,8–97,3%, для САТ-2/Саудовская Аравия 7/2000 – 96,5–99,1%, для САТ-3/Бечуаналенд 1/65 – 94,5–98,5%. Для положительного контроля совпадение фактических и ожидаемых результатов составило 99,0–99,6%. В отрицательном контрольном образце геном и 146S частицы вируса ящура не обнаружены, что также соответствовало ожиданиям.

Таким образом, по результатам проведенного исследования корреляция спектрометрического способа определения концентрации 146S компонента культурального вируса ящура с ОТ-ПЦР-РВ и РСК составила 94,5–99,5%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен способ спектрометрического определения концентрации 146S частиц при оценке количества РНК вируса ящура, выделенной после иммунного захвата. Данный способ является дешевым, простым в исполнении, позволяет определять концентрацию 146S частиц вируса ящура в неинактивированном сырье для вакцины с завышенным содержанием балластных компонентов.

Выявлено существование зависимости между концентрацией 146S частиц и количеством молекул РНК, выделенных из вирионов после их штаммоспецифического иммунного захвата и количественно определенным спектрометрическим методом. Представленный спектрометрический способ позволяет определять значение концентрации 146S компонента вируса ящура в неинактивированном сырье для вакцины с помощью предложенной линейной модели вида

$$C_{146S} = \frac{3,9 \times N_{\text{РНК } 146S} + 566\,783\,689}{280\,818\,944\,837}.$$

Установлено, что корреляция данного способа с ОТ-ПЦР-РВ и РСК составила 94,5–99,5%. Для положительного контроля совпадение фактических и ожидаемых результатов было 99,0–99,6%. В отрицательном контрольном образце геном и 146S частицы вируса ящура не обнаружены, что соответствовало ожиданиям.

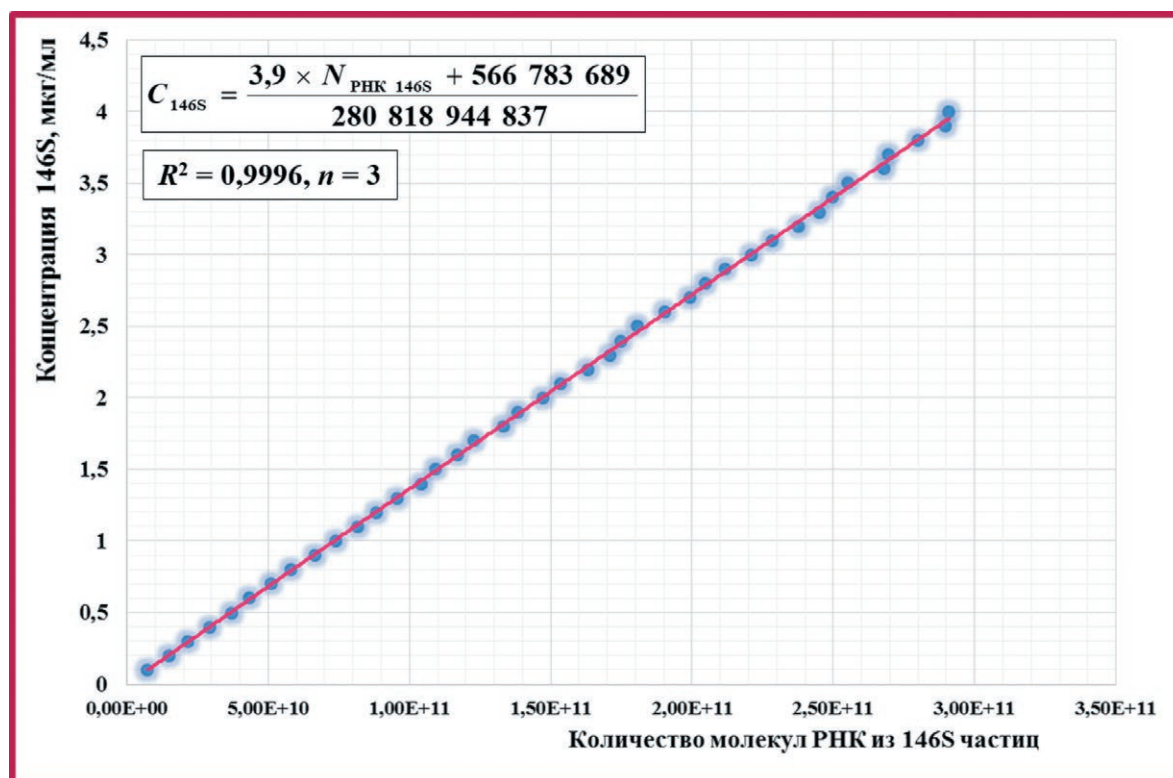


Рис. 2. Зависимость концентрации 146S частиц вируса ящура от количества молекул вирусной РНК в стандартных растворах. Количество молекул выражено в экспоненциальном формате (E = 10)

Fig. 2. Relationship between FMDV 146S particle concentration and the number of viral RNA molecules in standard solutions. The number of molecules is expressed in exponential notation (E = 10)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 1–3, 5, 8, 9, 12, 14, 15 см. REFERENCES)

- Пономарев А. П., Узюмов В. Л. Вирус ящура: структура, биологические и физико-химические свойства. Владимир: Фолиант; 2006. 250 с.
- Бондаренко А. Ф. Качественный и количественный иммунохимический анализ вирусных белков. Суздаль; 1994. 92 с.
- Лозовой Д. А., Михалишин Д. В., Доронин М. И., Щербаков А. В., Тимина А. М., Шишкова А. А. и др. Способ определения концентрации 146S-компонента вируса ящура в вирусосодержащем сырье для вакцины с применением метода обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Патент № 2619878 Российской Федерация, МПК G01N 33/58 (2006.01), C12Q 1/68 (2006.01). ФГБУ «ВНИИЗЖ». № 2016140460. Заявл. 14.10.2016. Оpubл. 18.05.2017. Бюл. № 14.
- Владимиров Ю. А., Потапенко А. Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов. М.: Высшая школа; 1989: 20–22.
- Капорский Л. Н. Оптическая плотность. В кн.: Физическая энциклопедия. Т. 3: Магнитоплазменный – Пойнтинга теорема. Гл. ред. А. М. Прохоров. М.: Большая Российская энциклопедия; 1992: 441.
- Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика: пер. с англ. М.: Мир, 1991. 544 с.

REFERENCES

- Foot and mouth disease (infection with foot and mouth disease virus). In: *OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2018; Chap. 3.1.8: 433–464. Available at: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_FMD.pdf.
- Lubroth J., Rodriguez L., Dekker A. Vesicular diseases. In: *Diseases of Swine*. Ed. by B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Allaire, D. J. Taylor. 9th ed. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing Professional; 2006: 517–536.
- Nucleotide Database of National Center for Biotechnology Information (NCBI). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/?term=FMDV+complete> (date of access: 25.02.2019).
- Ponomarev A. P., Uzyumov V. L. Foot-and-mouth disease virus: structure, biological, physical and chemical properties [Virus yashchura: struktura, biologicheskie i fiziko-himicheskie svoystva]. Vladimir: Foliant; 2006. 250 p. (in Russian)

Таблица 4

Степень совпадения фактических и ожидаемых результатов спектрометрического способа определения концентрации 146S частиц с ОТ-ПЦР-РВ и РСК ($n_{\text{иссл.}} = 3$)

Table 4

Compatibility of actual and expected results of 146S particle concentration determination by spectrometric method with rtRT-PCR and CFT ($n_{\text{tests}} = 3$)

Статус образца	Штамм вируса ящура	Количество образцов	Степень совпадения результатов спектрометрического способа с другими методами, %	
			ОТ-ПЦР-РВ [7]	РСК
опытные	А/Турция/2006	40	97,0–99,4	96,2–97,1
	А/ВНИИЗЖ/2015	40	96,8–99,3	94,9–97,0
	О/Приморский/2012	40	98,3–99,2	97,2–98,5
	О/Приморский/2014	40	98,0–99,3	97,0–98,1
	Азия-1/Таджикистан/2011	40	98,4–99,5	97,6–98,5
	С ₁ /Закарпатский/1972	40	97,0–97,7	95,2–97,1
	CAT-1/Ахалкалакский/62	40	96,1–97,3	94,8–96,0
	CAT-2/Саудовская Аравия 7/2000	40	98,0–99,1	96,5–98,2
контроль положительный	CAT-3/Бечуаналенд 1/65	40	97,9–98,5	94,5–97,9
	Азия-1/Таджикистан/2011	40	99,2–99,6	99,0–99,3
контроль отрицательный	—	40	100	100

5. Alexandersen S., Zhang Z., Donaldson A. L., Garland A. J. M. The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Comp. Pathol.* 2003; 129 (1): 1–36. DOI: 10.1016/s0021-9975(03)00041-0.
6. Bondarenko A. F. Qualitative and quantitative immunochemical assay of viral proteins [Kachestvennyj i kolichestvennyj immunohimicheskij analiz virusnyh belkov]. Suzdal; 1994. 92 p. (in Russian)
7. Lozovoy D. A., Mikhilishin D. V., Doronin M. I., Shcherbakov A. V., Timina A. M., Shishkova A. A., et al. Method for foot and mouth disease virus 146S-component concentration determination in virus-containing raw material for vaccine using reverse transcription-polymerase chain reaction method in real time mode. Patent No. 2619878 Russian Federation, Int. Cl. G01N 33/58 (2006.01), C12Q 1/68 (2006.01). FGBI "ARRIAH". No. 2016140460. Date of filing: 14.10.2016. Date of publication: 18.05.2017. Bull. No. 14. (in Russian)
8. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* 2006; 1 (2): 581–585. DOI: 10.1038/nprot.2006.83.
9. Peirson S. N., Butler J. N. RNA extraction from mammalian tissues. In: *Circadian Rhythms. Methods in Molecular Biology*™. Ed. by E. Rosato. 2007; 362: 315–327. DOI: 10.1007/978-1-59745-257-1_22.
10. Vladimirov Yu. A., Potapenko A. Ya. Physics and chemistry of photo-biological processes [Fiziko-himicheskie osnovy fotobiologicheskikh processov]. M.: Vysshaya shkola; 1989; 20–22. (in Russian)
11. Kaporsky L. N. Optical density [Opticheskaya plotnost']. In: *Encyclopedia of Physics. Vol. 3: Magnetoplasma – Poynting's theorem* [Fizicheskaya enciklopediya. T. 3: Magnitoplazmennyy – Poyntinga teorema]. Editor-in-Chief A. M. Prokhorov. M.: Great Soviet Encyclopedia; 1992: 441. (in Russian)
12. Glasel J. A. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques*. 1995; 18 (1): 62–63. PMID: 7702855.
13. Dawson R. M. C., Elliott D. C., Elliott W. H., Jones K. M. Data for Biochemical Research. Oxford: Clarendon Press; 1989. 592 p.
14. Newell D. B. A more fundamental International System of Units. *Physics Today*. 2014; 67 (7): 35–41. DOI: 10.1063/PT.3.2448.
15. Strohmaier K., Adam K.-H. Die Struktur des Virus der Maul- und Klauenseuche. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B*. 1976; 23 (5/6): 483–506. DOI: 10.1111/j.1439-0450.1976.tb01628.x.

Поступила 23.07.2020

Принята в печать 25.09.2020

Received on 23.07.2020

Approved for publication on 25.09.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Доронин Максим Игоревич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Михалишин Дмитрий Валерьевич, кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Стариков Вячеслав Алексеевич, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Лозовой Дмитрий Анатольевич, доктор ветеринарных наук, доцент, г. Владимир, Россия.

Елькина Юлия Сергеевна, аспирант, технолог лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Борисов Алексей Валерьевич, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Maksim I. Doronin, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Dmitry V. Mikhilishin, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Vyacheslav A. Starikov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Dmitry A. Lozovoy, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Vladimir, Russia.

Yulia S. El'kina, Post-Graduate Student, Technologist, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Alexey V. Borisov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Исследование лечебного действия термальной воды региона Афьонкарахисар на экспериментально индуцированный нефрит у мышей

Bülent Elitok¹, Yasin Agilonu², Yavuz Ulusoy³, Bahadır Kiliç⁴

¹ Университет Афьон Коджатеппе, г. Афьонкарахисар, Турция

² Турция

^{3, 4} Центральный научно-исследовательский институт ветеринарного контроля, Министерство сельского и лесного хозяйства, г. Анкара, Турция

¹ ORCID 0000-0003-3336-4479, e-mail: elitok1969@hotmail.com

³ e-mail: yavuz.ulusoy@tarim.gov.tr

⁴ e-mail: bahadir.kilinc@tarim.gov.tr

РЕЗЮМЕ

Целью настоящего исследования является определение эффективности применения термоминеральной воды региона Афьонкарахисар в лечении нефрита. Для этой цели использовали 40 мышей-альбиносов одного возраста. Нефрит воспроизвели путем добавления аденина в их корм из расчета 0,2% на протяжении 6 недель. Перед началом 21-дневного курса лечения минеральной водой индуцированного нефрита мышей разделили на две равные группы: контрольную и экспериментальную. Животных контрольной группы ежедневно выпаивали водопроводной водой и купали в ней, животным экспериментальной группы ежедневно давали свежую воду из горячего источника Süreyya I, а также устраивали ежедневные ванны с использованием этой воды. Клинические, гематологические, биохимические и гистопатологические исследования проводили до исследования, после развития нефрита, а также на 1, 7, 14 и 21-й день эксперимента. Полученные результаты показали, что после развития нефрита уровни лейкоцитов (WBC), нейтрофилов (NEUT) и среднего объема эритроцитов (MCV) в крови значительно увеличились ($p < 0,05$), в то время как уровни эритроцитов (RBC), гемоглобина (HB), гематокрита (HCT), лимфоцитов (LYM), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH) и средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC) значительно снизились ($p < 0,05$). Также было установлено, что после развития нефрита уровни аспартатаминотрансферазы (AST), гамма-глутамилтрансферазы (GGT), глюкозы (GLU), содержание азота мочевины в крови (BUN) и уровень IgG значительно повысились ($p < 0,05$), а уровни общего белка (TP) и альбумина (ALB) значительно снизились ($p < 0,05$). В конце исследования у животных из экспериментальной группы все параметры крови нормализовались, тогда как у мышей контрольной группы такого эффекта не наблюдалось. Это позволило сделать вывод, что термальная вода из источника Süreyya I эффективна в лечении нефрита и может рассматриваться как один из вариантов терапии.

Ключевые слова: Афьонкарахисар, бальнеотерапия, биохимия, мышь, нефрит, лечение.

Благодарность: Авторы выражают признательность Mr. Suayr Demirel за его поддержку во время исследования.

Для цитирования: Elitok Bülent, Agilonu Yasin, Ulusoy Yavuz, Kiliç Bahadır. Исследование лечебного действия термальной воды региона Афьонкарахисар на экспериментально индуцированный нефрит у мышей. *Ветеринария сегодня*. 2020; 4 (35): 313–321. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-313-321.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Elitok Bülent, доктор наук, доцент, кафедра терапии факультета ветеринарной медицины, Университет Афьон Коджатеппе, 03200, Турция, г. Афьонкарахисар, e-mail: elitok1969@hotmail.com.

UDC 619:616.61-002:599.323.4:615.327

Investigation of healing effects of Afyonkarahisar Region thermal spring water on experimentally-induced nephritis in mice

Bülent Elitok¹, Agilonu Yasin², Yavuz Ulusoy³, Bahadır Kiliç⁴

¹ Afyon Kocatepe University, Afyonkarahisar, Turkey

² Turkey

^{3, 4} Veterinary Control Central Research Institute, Ministry of Agriculture and Forestry, Ankara, Turkey

¹ ORCID 0000-0003-3336-4479, e-mail: elitok1969@hotmail.com

³ e-mail: yavuz.ulusoy@tarim.gov.tr

⁴ e-mail: bahadir.kilinc@tarim.gov.tr

SUMMARY

The aim of this study was to determine the efficacy of Afyonkarahisar termomineral water in the treatment of nephritis. For this purpose, 40 Albino mouse at the same daily age were used. Nephritis was induced by adding adenine to their feed at a rate of 0.2% for 6 weeks. After nephritis was induced, a 21-day treatment period was started, and the mice were equally divided into two groups as control and study. While control group mice were received tap water daily and bathing in tap water, study group animals were given fresh Süreyya I hot spring water daily and bathing in this water. Clinical, hematological, blood biochemical and histopathological examinations were performed before the study, after nephritis formation, and on days of 1st, 7th, 14th and 21st of treatment period. Results of this study showed that WBC, NEUT and MCV levels increased significantly ($p < 0.05$) following nephritis formation, while RBC, HB, HCT, LYM, MCH and MCHC levels decreased significantly ($p < 0.05$). It was also determined that AST, GGT, GLU, BUN and IgG levels of blood biochemical parameters were significantly increased ($p < 0.05$) and TP, ALB levels decreased significantly ($p < 0.05$) after nephritis formation. At the end of the study, it was seen that all the measured parameters turned to the normal range in the study group animals, whereas problems still continuing with control group animals. Consequently, it was concluded that Süreyya I hot spring water was very successful in the treatment of nephritis and considered as an option in the treatment of nephritis.

Key words: Afyonkarahisar, balneotherapy, biochemistry, mouse, nephritis, treatment.

Acknowledgements: The authors acknowledge to Mr. Suayp Demirel for his supports during the study.

For citation: Elitok Bülent, Yasin Agilonu, Ulusoy Yavuz, Kilinç Bahadır. Investigation of healing effects of Afyonkarahisar Region thermal spring water on experimentally-induced nephritis in mice. *Veterinary Science Today*. 2020; 4 (35): 313–321. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-313-321.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Bülent Elitok, Doctor of Science, Associate Professor, Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, 03200, Turkey, Afyonkarahisar, e-mail: elitok1969@hotmail.com.

ВВЕДЕНИЕ

Почки играют важную роль в метаболизме, участвуя в минеральном обмене, регулируя объем жидкости в организме и кислотно-щелочной баланс, тем самым нормализуя соотношение компонентов буферных систем [1]. Нефрит – это состояние, при котором нефроны, являющиеся структурно-функциональными единицами почек, воспаляются, что может отрицательно сказаться на деятельности органа [2].

Было доказано, что применение воды из горячих источников показывает высокий эффект при лечении нефропатий у людей [3]. Так, Р. В. Носсо сообщил, что бальнеотерапия очень важна для восстановления здоровья, особенно при лечении хронического нефрита [4]. Кроме того, щелочные минеральные воды широко используются для детоксикации организма [5, 6]. По данным А. Л. Rodgers, хорошие результаты в профилактике и терапии оксалатных кальциевых камней в почках показывает применение магнево-кальциевых минеральных вод [7]. R. Siener et al. сообщили, что потребление воды, содержащей магний и бикарбонат, регулирует pH мочи, экскрецию магния и цитрата, предотвращает образование оксалатных камней и повышенное выведение кальция [8].

Цель данного исследования – оценить возможность использования термальной воды из источника Süreyya I, которой богата провинция Афьонкарахисар, в лечении индуцированного нефрита.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Практическая часть данного исследования была проведена в Центре прикладных и экспериментальных исследований животных Университета Афьон Коджатеппе в соответствии с инструкциями Комитета по этике Университета экспериментальных исследований животных Афьон Коджатеппе (AKUHADYЕК) согласно отчету

под номером 59-18 и была утверждена в качестве магистерской диссертации Комитетом по научно-исследовательским проектам Университета Афьон Коджатеппе (AKÜBAPK), номер проекта 18.SAĞ.BİL.12.

В исследовании использовали 40 мышей-альбиносов одного возраста. Животных содержали в оптимальных условиях, обеспечивая им стабильные влажность, температуру и продолжительность светового дня (12 часов). На протяжении всего эксперимента (21 сут) мыши получали пищу *ad libitum*.

До начала эксперимента у 4 из 40 лабораторных животных взяли образцы крови. С целью индуцирования нефрита оставшимся мышам на протяжении 6 недель добавляли в корм 0,2% аденина [9]. После развития нефрита у 4 из 36 мышей взяли пробы крови, а также образцы тканей для гистопатологических исследований. Остальных мышей в количестве 32 голов случайным образом разделили поровну на 2 группы – контрольную (CG) и экспериментальную (SG). Шестнадцати мышам контрольной группы был обеспечен свободный доступ к поилкам со свежей водопроводной водой. Животных этой группы в течение всего срока исследования в одно и то же время по одному разу каждый день купали по 15 мин в водопроводной воде, температура которой составляла $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$.

Мышей экспериментальной группы поили свежей термальной водой, к которой был обеспечен ежедневный доступ. Животных ежедневно в одно и то же время в течение 15 мин купали в свежей термальной воде, температура которой составляла $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$.

Свойства термальной воды. Вода из термального источника Süreyya I, используемая в данном исследовании, имеет общее содержание минералов 4046,8 мг/л, относится к группе термоминеральных вод и содержит бикарбонат натрия, углекислый газ, магний, кальций, фтор и кремний.

При проведении *клинических исследований* учитывали следующие параметры: частота дыхания (R), температура тела (T) и частота сердечных сокращений (P).

Отбор проб крови и ткани почек осуществляли под анестезией с использованием кетамина (100 мг/кг) и ксилазина (10 мг/кг) [10] до начала исследования, после развития нефрита и на 1, 7, 14 и 21-е сут после начала эксперимента.

Гематологические исследования. С помощью коммерческого набора для анализатора Chemray (Rayto Life and Analytical Sciences Co., Китай) измеряли следующие показатели крови: лейкоциты (WBC), лимфоциты (LYM), гемоглобин (HB), средний объем эритроцитов (MCV), гематокрит (HCT), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (MCHC), нейтрофилы (NEUT), эозинофилы (EOS), эритроциты (RBC), моноциты (MON) и базофилы (BAS).

Биохимические исследования крови. Содержание азота мочевины (BUN), аспартатаминотрансферазу (AST), гамма-глутамилтрансферазу (GGT), общий белок (TP), глюкозу (GLU) измеряли с помощью анализатора Cobas Integra 400 Plus (Roche Diagnostics GmbH, Германия). Уровень иммуноглобулина G (IgG) определяли с помощью ChemWell, Chromate 4300 (Awareness Technology, Inc., США) с использованием коммерческих наборов для иммуноферментного анализа (Sunred Biological Technology Co., Ltd, Китай).

Анализ газового состава крови. С помощью пластиковых шприцов, содержащих 500 МЕ жидкого гепарина, отбирали 1 мл крови; кончик стерильного шприца немедленно закрывали колпачком, а измерения проводили не более чем через 3 ч после отбора проб. С помощью ветеринарного анализатора газов крови и электролитов EDAN i15 Vet (EDAN Instruments, Inc., Китай) с использова-

нием коммерческих картриджей в образцах крови определяли парциальное давление углекислого газа ($p\text{CO}_2$), pH, общую концентрацию углекислого газа (TCO_2), бикарбонат (HCO_3^-), сдвиг буферных оснований (BE), калий (K^+), натрий (Na^+), хлор (Cl^-), кальций (Ca^{2+}).

Гистопатологические исследования. Образцы почек, полученные по упомянутой выше методике, отправляли в 10%-м формалине в патологоанатомическую лабораторию Центрального научно-исследовательского института ветеринарного контроля Министерства сельского и лесного хозяйства для проведения гистопатологических исследований. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином и исследовали под световым микроскопом.

Статистический анализ результатов по группам проводили по методу дисперсионного анализа (ANOVA). Для определения значимости различий в контрольной и экспериментальной группах использовали тест Дункана. Статистический анализ проводили с помощью программы SPSS Statistics 18.1 (IBM, США). Данные были выражены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка и считались значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для эксперимента были взяты мыши, родившиеся в один день, поэтому различия по этому критерию между группами не было ($p > 0,05$). Средняя масса тела до начала исследования составляла 29,7 г, тогда как после развития нефрита она уменьшилась до 28,7 г. Значительное ($p < 0,05$) снижение наблюдалось в пересчете на средние значения массы тела. На 21-е сут эксперимента было отмечено, что средняя масса тела мышей контрольной группы составила 28,1 г, в то время как у мышей экспериментальной группы – 29,1 г ($p < 0,05$).

Таблица 1
Статистическое сравнение температуры тела, частоты пульса и частоты дыхания

Table 1
Statistical comparison of body temperature, pulse frequency and respiratory rate

Сроки измерения показателей по группам		Показатели ($\bar{X} \pm \text{SD}$)		
		T (°C)	P (ударов/мин)	R (частота/мин)
BS ($n = 40$)		37,10 $\pm$ 0,16 ^b	326,30 $\pm$ 44,22 ^e	117,04 $\pm$ 18,36 ^f
ANF ($n = 36$)		38,50 $\pm$ 0,14 ^a	327,31 $\pm$ 45,10 ^e	131,24 $\pm$ 25,43 ^e
AT 1-е сут	CG ($n = 16$)	38,50 $\pm$ 0,20 ^a	331,28 $\pm$ 33,40 ^d	132,54 $\pm$ 21,45 ^e
	SG ($n = 16$)	38,30 $\pm$ 0,18 ^a	363,14 $\pm$ 32,20 ^b	141,14 $\pm$ 22,25 ^c
AT 7-е сут	CG ($n = 12$)	38,30 $\pm$ 0,20 ^a	334,26 $\pm$ 27,20 ^e	135,30 $\pm$ 17,12 ^d
	SG ($n = 12$)	38,20 $\pm$ 0,10 ^a	378,23 $\pm$ 25,44 ^a	148,10 $\pm$ 15,23 ^b
AT 14-е сут	CG ($n = 8$)	38,20 $\pm$ 0,10 ^a	342,16 $\pm$ 22,23 ^c	137,10 $\pm$ 8,05 ^d
	SG ($n = 8$)	38,10 $\pm$ 0,12 ^a	374,25 $\pm$ 21,14 ^a	157,30 $\pm$ 7,20 ^a
AT 21-е сут	CG ($n = 4$)	38,10 $\pm$ 0,16 ^a	345,13 $\pm$ 9,21 ^c	142,18 $\pm$ 6,33 ^c
	SG ($n = 4$)	38,00 $\pm$ 0,10 ^a	376,44 $\pm$ 6,12 ^a	159,23 $\pm$ 4,22 ^a

^{a-f} Значения в столбце являются статистически значимыми ($p < 0,05$).

^{a-f} The values in the column are statistically significant ($p < 0,05$).

BS – до исследования (before study), ANF – после развития нефрита (after nephritis formation), AT – после лечения (after treatment),

CG – контрольная группа (control group), SG – экспериментальная группа (study group).

Таблица 2
Результаты гематологических исследований крови животных
Table 2
Results of hematology blood tests

Сроки измерения показателей по группам		Показатели (X ± SD)											
		WBC (10 ⁹ /mm ³)	RBC (10 ⁶ /mm ³)	HB (g/dl)	HCT (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	LYM (%)	NEUT (%)	EOS (%)	MON (%)	BAS (%)
BS (n = 40)		8,38 ± 2,32 ^e	7,80 ± 2,32 ^b	13,53 ± 2,48 ^a	43,36 ± 5,32 ^a	55,04 ± 5,12 ^{bc}	17,19 ± 2,16 ^a	32,08 ± 2,43 ^a	60,50 ± 2,10 ^a	34,10 ± 4,14 ^f	2,30 ± 0,50	3,50 ± 0,40	NS
ANF (n = 36)		16,14 ± 4,10 ^a	5,34 ± 1,27 ^d	7,67 ± 3,34 ^e	31,37 ± 4,16 ^f	58,69 ± 5,24 ^a	14,38 ± 2,21 ^d	24,47 ± 3,06 ^d	47,84 ± 4,20 ^e	48,14 ± 5,28 ^a	2,56 ± 0,30	3,40 ± 1,50	NS
AT 1-е сут	CG (n = 16)	16,21 ± 4,20 ^a	5,31 ± 1,56 ^d	7,65 ± 3,16 ^e	31,43 ± 4,13 ^f	59,20 ± 5,32 ^a	14,43 ± 2,08 ^d	24,34 ± 3,32 ^d	47,34 ± 4,20 ^e	48,21 ± 4,16 ^a	2,68 ± 0,56	3,50 ± 0,40	NS
	SG (n = 16)	15,23 ± 3,04 ^{ab}	6,04 ± 1,47 ^{cd}	8,07 ± 3,14 ^{de}	32,78 ± 3,47 ^e	54,28 ± 5,16 ^c	13,35 ± 2,13 ^c	24,83 ± 3,02 ^d	47,30 ± 4,10 ^e	46,68 ± 4,25 ^b	2,34 ± 0,50	3,40 ± 0,30	NS
AT 7-е сут	CG (n = 12)	16,10 ± 2,42 ^a	5,48 ± 1,08 ^d	7,81 ± 2,06 ^e	32,14 ± 2,15 ^e	58,66 ± 3,27 ^a	14,28 ± 1,46 ^c	24,28 ± 2,36 ^d	47,32 ± 2,30 ^e	48,03 ± 2,38 ^a	2,54 ± 0,30	3,20 ± 0,30	NS
	SG (n = 12)	14,03 ± 2,05 ^b	6,78 ± 1,04 ^c	9,47 ± 2,03 ^c	38,22 ± 2,23 ^c	56,38 ± 3,41 ^b	13,94 ± 1,35 ^c	24,80 ± 2,48 ^d	53,38 ± 2,14 ^c	42,38 ± 2,43 ^c	2,10 ± 0,20	3,10 ± 0,30	NS
AT 14-е сут	CG (n = 8)	15,86 ± 1,23 ^{ab}	5,81 ± 0,68 ^c	8,02 ± 1,17 ^d	34,18 ± 1,54 ^e	58,82 ± 3,05 ^a	13,81 ± 0,43 ^c	23,44 ± 1,37 ^e	48,16 ± 1,30 ^e	47,30 ± 1,54 ^{ab}	2,42 ± 0,40	3,60 ± 0,30	NS
	SG (n = 8)	12,13 ± 1,17 ^c	7,74 ± 0,51 ^b	11,34 ± 1,09 ^b	41,45 ± 1,56 ^b	53,54 ± 3,20 ^{cd}	14,65 ± 0,52 ^c	27,39 ± 1,27 ^c	56,24 ± 1,14 ^b	39,34 ± 1,20 ^d	2,05 ± 0,20	3,00 ± 0,20	NS
AT 21-е сут	CG (n = 4)	14,86 ± 0,67 ^b	5,97 ± 0,44 ^b	8,57 ± 0,68 ^d	35,13 ± 0,67 ^d	58,83 ± 2,12 ^a	14,36 ± 0,34 ^c	24,40 ± 0,44 ^d	50,36 ± 0,68 ^d	45,23 ± 0,46 ^b	2,32 ± 0,10	3,80 ± 0,20	NS
	SG (n = 4)	9,23 ± 0,48 ^d	8,46 ± 0,37 ^a	13,01 ± 0,53 ^a	44,02 ± 0,54 ^a	52,03 ± 2,09 ^d	15,37 ± 0,41 ^b	29,56 ± 0,39 ^b	60,10 ± 0,57 ^a	36,03 ± 0,57 ^e	2,00 ± 0,10	2,60 ± 0,10	NS

^{a-f} Значения в столбце являются статистически значимыми ($p < 0,05$).

^{a-f} The values in the column are statistically significant ($p < 0,05$).

BS – до исследования (before study), ANF – после развития нефрита (after nephritis formation), AT – после лечения (after treatment), CG – контрольная группа (control group), SG – экспериментальная группа (study group), NS – не значимо (non-significant), WBC – лейкоциты (white blood cells), RBC – эритроциты (red blood cells), HB – гемоглобин (hemoglobin), HCT – гематокрит (hematocrit), MCV – средний объем эритроцитов (mean corpuscular volume), MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците (mean corpuscular hemoglobin), MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците (mean corpuscular hemoglobin concentration), LYM – лимфоциты (lymphocyte), NEUT – нейтрофилы (neutrophils), EOS – эозинофилы (eosinophils), MON – моноциты (monocyte), BAS – базофилы (basophils).

Клинические исследования животных

Результаты клинических исследований животных представлены в таблице 1. Из данных, представленных в ней, видно, что при развитии нефрита наблюдались значительные ($p < 0,05$) изменения температуры тела, частоты дыхания и сердечных сокращений. Так, средние показатели R и P увеличились уже на начальном этапе эксперимента, увеличение было более значимым ($p < 0,05$) у мышей из экспериментальной группы.

Гематологические исследования

Результаты гематологического исследования представлены в таблице 2, из которой видно, что после развития нефрита уровни NEUT, MCV, WBC статистически значимо увеличились ($p < 0,05$), тогда как уровни HCT, HB, RBC, LYM, MCHC и MCH значительно снизились ($p < 0,05$). К 21-м сут исследования было выявлено, что уровни LYM, HCT, RBC, HB, MCH и MCHC увеличивались в обеих группах, при этом уровни NEUT, MCV, WBC снижались. Эти изменения были статистически более значимыми ($p < 0,05$) у животных в экспериментальной группе.

Биохимические исследования крови

Результаты биохимического анализа крови приведены в таблице 3.

Как видно из представленных в ней данных, после развития нефрита уровни GGT, AST, BUN, GLU и IgG значительно увеличились ($p < 0,05$), в то время как уровни ALB и TP значительно снизились ($p < 0,05$). Затем значения показателей TP и ALB повышались в обеих группах, тогда как уровни GGT, AST, BUN, GLU и IgG снижались ($p < 0,05$). Было отмечено, что к концу эксперимента наиболее значимые различия наблюдались у мышей экспериментальной группы ($p < 0,05$).

Исследования газового состава крови

Результаты исследования газового состава крови приведены в таблице 4.

При анализе полученных данных было отмечено, что после развития нефрита уровни pCO_2 , pH, HCO_3^- , BE, TCO_2 , Ca^{2+} и K^+ снизились, тогда как уровни LACT, Na^+ и Cl^- повысились. Однако к 21-м сут исследования эти показатели начали нормализовываться. При этом к окончанию эксперимента наиболее отчетливые изменения наблюдались у животных экспериментальной группы, и разница была статистически значимой ($p < 0,05$).

Результаты гистопатологических исследований

При проведении исследований почечных биоптатов, взятых у мышей после развития нефрита, обнаруживали инфильтрацию в просвете сосудов и гломерулярные

Таблица 3
Результаты биохимических исследований крови животных

Table 3
Blood biochemical findings of the animals

Сроки измерения показателей по группам		Показатели (X ± SD)						
		AST (IU/L)	GGT (IU/L)	TP (g/dl)	ALB (g/dl)	GLU (g/dl)	BUN (mmol/L)	IgG (mg/ml)
BS (n = 40)		96,72 ± 12,38 ^h	3,63 ± 0,56 ^e	53,96 ± 5,47 ^b	33,78 ± 2,34 ^a	172,15 ± 0,69 ^d	21,74 ± 3,25 ^f	3,17 ± 1,45 ^e
ANF (n = 36)		269,17 ± 32,45 ^a	8,96 ± 3,43 ^a	34,06 ± 6,45 ^f	21,08 ± 3,44 ^e	275,27 ± 0,56 ^a	36,48 ± 5,23 ^a	8,16 ± 3,57 ^a
АТ 1-е сут	CG (n = 16)	272,13 ± 42,34 ^a	8,97 ± 3,71 ^a	34,04 ± 6,48 ^f	21,01 ± 3,66 ^e	208,13 ± 0,30 ^a	37,04 ± 6,18 ^a	8,45 ± 3,44 ^a
	SG (n = 16)	263,12 ± 38,32 ^{ab}	8,78 ± 3,58 ^a	34,69 ± 5,17 ^f	22,23 ± 3,32 ^d	203,21 ± 0,44 ^b	36,91 ± 6,53 ^a	7,79 ± 3,08 ^b
АТ 7-е сут	CG (n = 12)	253,25 ± 23,21 ^b	8,61 ± 2,45 ^a	34,23 ± 4,31 ^f	22,16 ± 2,54 ^d	196,11 ± 0,48 ^b	36,76 ± 4,21 ^a	8,17 ± 2,14 ^a
	SG (n = 12)	231,32 ± 19,34 ^c	7,41 ± 2,32 ^b	42,14 ± 4,32 ^d	26,34 ± 2,56 ^c	178,14 ± 0,53 ^c	28,64 ± 4,06 ^d	6,10 ± 2,03
АТ 14-е сут	CG (n = 8)	234,07 ± 14,54 ^c	8,57 ± 1,37 ^{ab}	36,12 ± 3,21 ^{ef}	23,02 ± 1,21 ^{cd}	187,35 ± 0,48 ^c	34,17 ± 2,34 ^b	7,78 ± 1,34 ^b
	SG (n = 8)	162,44 ± 15,16 ^f	5,73 ± 1,44 ^c	48,16 ± 3,09 ^c	30,94 ± 1,41 ^b	173,43 ± 0,53 ^d	24,13 ± 2,11 ^e	4,32 ± 1,27 ^d
АТ 21-е сут	CG (n = 4)	213,47 ± 10,21 ^d	7,32 ± 0,65 ^b	38,03 ± 1,53 ^e	25,21 ± 0,58 ^c	183,22 ± 0,10 ^c	30,14 ± 1,08 ^c	6,48 ± 0,65 ^c
	SG (n = 4)	103,34 ± 8,11 ^g	3,98 ± 0,59 ^d	56,05 ± 1,48 ^a	33,35 ± 0,49 ^a	166,17 ± 0,10 ^e	20,83 ± 0,53 ^f	3,15 ± 0,51 ^e

^{a-h} Значения в столбце являются статистически значимыми ($p < 0,05$).

^{a-h} The values in the column are statistically significant ($p < 0,05$).

BS – до исследования (before study), ANF – после развития нефрита (after nephritis formation),

АТ – после лечения (after treatment), CG – контрольная группа (control group), SG – опытная группа (study group).

AST – аспартатаминотрансфераза (aspartate aminotransferase),

GGT – гамма-глутамилтрансфераза (gamma-glutamyl transferase), TP – общий белок (total protein),

ALB – альбумин (albumin), GLU – глюкоза (glucose), BUN – содержание азота мочевины в крови (blood urea nitrogen),

IgG – уровень иммуноглобулина G (immunoglobulin G).

Таблица 4
Результаты исследования газового состава крови
Table 4
Blood gases findings of the animals

Сроки измерения показателей по группам		Показатели (X ± SD)										
		pH	pCO ₂ (mmHg)	HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	BE (mEq/L)	TCO ₂ (mmol/L)	LACT (mmol/L)	K ⁺ (mmol/L)	Na ⁺ (mmol/L)	Cl ⁻ (mmol/L)	Ca ²⁺ (mmol/L)	
BS (n = 40)		7,32 ± 0,03 ^b	44,03 ± 0,42 ^a	21,91 ± 0,57 ^b	-3,3 ± 0,28 ^b	15,41 ± 1,58 ^a	4,68 ± 1,47 ^{cd}	8,78 ± 2,36 ^a	163,28 ± 14,18 ^f	117,34 ± 12,43 ^g	10,68 ± 2,09 ^a	
ANF (n = 36)		7,22 ± 0,02 ^d	32,78 ± 2,14 ^e	13,02 ± 1,63 ^{de}	-13,1 ± 0,45 ^f	11,14 ± 2,27 ^d	7,03 ± 2,05 ^a	5,69 ± 2,21 ^d	264,32 ± 17,23 ^a	196,48 ± 13,44 ^a	6,47 ± 2,12 ^c	
AT 1-е сут	CG (n = 16)	7,22 ± 0,02 ^d	32,68 ± 2,32 ^e	12,91 ± 1,43 ^e	-13,2 ± 0,44 ^f	12,05 ± 2,29 ^c	7,15 ± 2,28 ^a	5,58 ± 2,43 ^d	267,31 ± 13,21 ^a	193,57 ± 14,44 ^a	6,51 ± 2,23 ^c	
	SG (n = 16)	7,23 ± 0,03 ^d	33,07 ± 2,48 ^d	13,64 ± 1,44 ^e	-12,4 ± 0,35 ^e	11,07 ± 2,33 ^d	6,87 ± 2,13 ^{ab}	5,31 ± 1,47 ^d	253,36 ± 18,25 ^{ab}	182,37 ± 12,24 ^b	6,89 ± 2,38 ^c	
AT 7-е сут	CG (n = 12)	7,24 ± 0,02 ^d	33,78 ± 2,23 ^d	14,02 ± 0,68 ^{de}	-11,9 ± 0,34 ^{de}	11,70 ± 1,35 ^a	6,49 ± 1,68 ^b	5,37 ± 1,13 ^d	248,22 ± 15,12 ^b	181,38 ± 11,47 ^b	6,96 ± 1,43 ^c	
	SG (n = 12)	7,30 ± 0,02 ^{bc}	37,48 ± 2,15 ^{bc}	17,82 ± 0,49 ^c	-7,5 ± 0,21 ^c	11,56 ± 1,47 ^{cd}	4,78 ± 1,37 ^c	6,22 ± 1,37 ^c	214,25 ± 13,27 ^d	158,34 ± 9,33 ^d	8,02 ± 1,35 ^b	
AT 14-е сут	CG (n = 8)	7,27 ± 0,02 ^c	35,12 ± 1,54 ^c	15,61 ± 0,43 ^d	-10,1 ± 0,17 ^d	12,11 ± 0,66 ^c	6,54 ± 0,67 ^b	5,91 ± 0,68 ^{cd}	225,34 ± 11,11 ^c	164,33 ± 8,13 ^c	7,17 ± 0,76 ^{bc}	
	SG (n = 8)	7,34 ± 0,03 ^b	42,02 ± 1,13 ^b	21,89 ± 0,31 ^b	-3,2 ± 0,14 ^b	14,80 ± 0,47 ^{cd}	4,22 ± 0,53 ^c	7,53 ± 0,67 ^b	178,35 ± 10,28 ^d	121,31 ± 7,35 ^f	9,49 ± 0,77 ^{ab}	
AT 21-е сут	CG (n = 4)	7,30 ± 0,02 ^{bc}	36,87 ± 0,56 ^{bc}	17,52 ± 0,23 ^d	-7,7 ± 0,10 ^c	12,83 ± 0,39 ^c	6,04 ± 0,38 ^b	6,18 ± 0,43 ^c	203,44 ± 6,16 ^c	147,34 ± 5,14 ^e	8,06 ± 0,45 ^b	
	SG (n = 4)	7,39 ± 0,02 ^a	44,13 ± 0,47 ^a	25,79 ± 0,19 ^a	-1,3 ± 0,10 ^a	15,82 ± 0,28 ^a	3,89 ± 0,39 ^d	8,99 ± 0,33 ^a	147,34 ± 5,22 ^a	103,42 ± 3,28 ^h	10,84 ± 0,38 ^a	

^{a-h} Значения в столбце являются статистически значимыми ($p < 0,05$).

^{a-h} The values in the column are statistically significant ($p < 0,05$).

BS – до исследования (before study), ANF – после развития нефрита (after nephritis formation), AT – после лечения (after treatment),

CG – контрольная группа (control group), SG – опытная группа (study group).

pH – концентрация ионов водорода (hydrogen ion concentration), pCO₂ – парциальное давление углекислого газа (CO₂ partial pressure),

HCO₃⁻ – бикарбонат (bicarbonate), BE – сдвиг буферных оснований (base excess), TCO₂ – общая концентрация углекислого газа (total CO₂),

LACT – лактат (lactate), K⁺ – калий (potassium), Na⁺ – натрий (sodium), Cl⁻ – хлор (chlorine), Ca²⁺ – кальций (calcium).

изменения, что позволяло диагностировать гломеруло-нефрит (рис. 1).

Было обнаружено, что у животных экспериментальной группы, получавших воду из горячего источника, к концу лечения наблюдалась положительная динамика (рис. 2), в то время как у мышей контрольной группы, получавших водопроводную воду, продолжали наблюдаться гистопатологические изменения в почках, характерные для нефрита (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что средняя масса тела мышей снижалась с развитием нефрита, и эта разница была статистически значимой ($p < 0,05$). На 21-е сут эксперимента было отмечено, что средняя масса тела мышей контрольной группы была ниже, чем животных экспериментальной группы ($p < 0,05$). Эти данные соответствуют заявлению U. Lange et al. о том, что минеральные воды способствуют расщеплению жира и уменьшают всасывание жира из кишечника, что приводит к снижению живой массы [11].

У мышей с индуцированным нефритом зафиксировано повышение температуры тела по сравнению со средней температурой до начала исследования ($p < 0,05$). При этом каких-либо значимых ($p > 0,05$) изменений в показателях R и P с началом лечения не наблюдалось; отмечали, что уровни R и P увеличивались в обеих группах, но самые высокие уровни были зафиксированы у животных экспериментальной группы. Эти данные подтверждают выводы исследователей P. Gres-Otto et al., которые сообщали, что санаторно-курортное лечение улучшает состояния периферических сосудов, а также повышает частоту сердечных сокращений и, соответственно, частоту дыхания [12]. Кроме того, сообщалось, что горячие ванны стимулируют активность симпатической нервной системы, приводя к повышению кровяного давления, индуцируют увеличение частоты дыхания и сердечных сокращений [13].

Было выявлено, что средние показатели NEUT, WBC и MCV у животных контрольной группы к 21-м сут исследования оставались на высоких уровнях, в то время как у мышей экспериментальной группы наблюдалось их достоверное снижение. Так, имеются сообщения о том, что гипертермальные воды оказывают иммуносупрессивное действие, при этом количество Т-лимфоцитов и EOS значительно снижается как у здоровых людей, так и у лиц с хроническими воспалительными заболеваниями [14].

Установлено, что средние значения RBC, HB, HCT, MCH и MCHC статистически снизились ($p < 0,05$) у животных после развития нефрита. Это согласуется с исследованиями A. Rahman et al., в которых сообщалось о развитии анемии у крыс с индуцированным нефритом, которое объясняется снижением продукции эритропоэтина, вызванным приемом аденина [15]. Нормализация уровня эритроцитов после лечения у животных из экспериментальной группы доказывает, что термальная минеральная вода из источника Süreyya I чрезвычайно эффективна для заживления повреждений почек и восстановления гематологических показателей. Известно, что дефицит магния является одной из причин воспалительного синдрома. Нехватка этого микроэлемента вызывает дислипидемию, артериальную гипертензию, инсулинорезистентность, дисфункцию эндотелия и протромбические различия

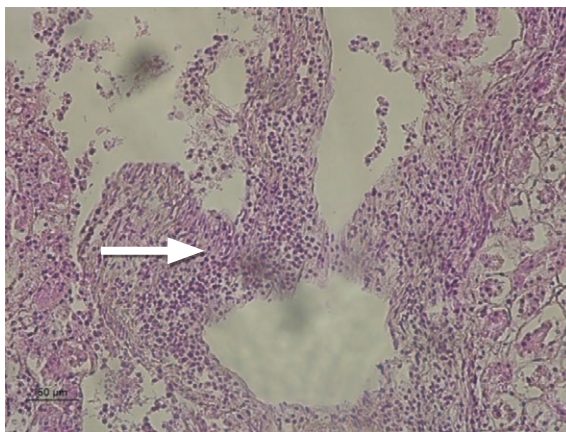


Рис. 1. Выраженный гломерулонефрит (белая стрелка), увеличение $10\times-40\times$

Fig. 1. Severe glomerulonephritis (white arrow), $10\times-40\times$

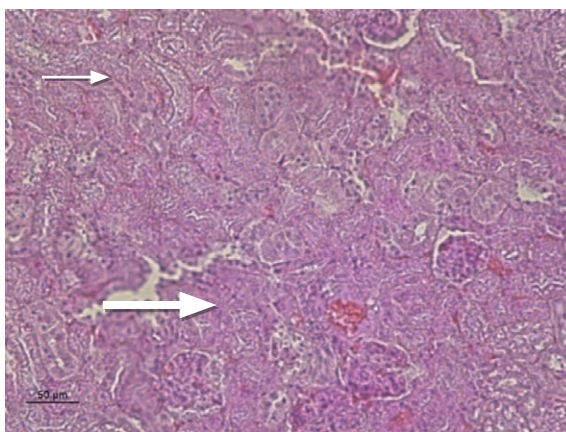


Рис. 2. Восстановление структуры канальцев и клубочков на 21-е сут у животных экспериментальной группы (канальцы – тонкая стрелка, клубочки – толстая стрелка), увеличение $10\times-20\times$

Fig. 2. Completely healed tubule and glomerul structure at the end of day 21 in study group animals (tubule – thin arrow, glomerul – thick arrow), $10\times-20\times$

с регуляцией маркеров воспаления и окислительного стресса [16]. В начале данного исследования у мышей с индуцированным нефритом маркеры воспаления были на высоком уровне, после 21-дневного курса лечения зафиксировано достоверное снижение этих показателей, что, очевидно, обусловлено употреблением богатой магнием минеральной воды из источника Süreyya I.

После развития нефрита у мышей в настоящем исследовании было зафиксировано достоверное повышение уровней GGT, AST, BUN и IgG и снижение ALB, TP и GLU ($p < 0,05$). К 21-м сут водолечения нормализация показателей была особенно заметна в экспериментальной группе. Это согласуется с выводами С. Pereira et al., которые сообщали, что уровни мочевины, ALT, AST, CREA снижались, а уровни TP и ALB повышались в результате потребления минеральной воды при метаболическом синдроме, экспериментально индуцированном фруктозой [16]. Считается, что значительное

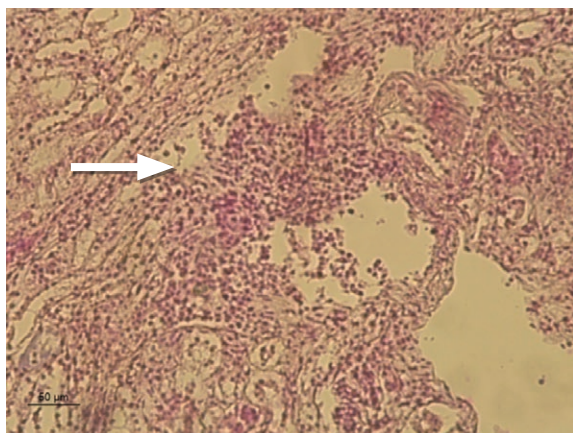


Рис. 3. Гистопатологические признаки гломерулонефрита на 21-е сут в срезах почечной ткани животных контрольной группы (белая стрелка), увеличение $10\times$ – $20\times$

Fig. 3. Continuation of the glomerulonephritis structure at the end of day 21 in control group animals (white arrow), $10\times$ – $20\times$

снижение уровня альбумина после образования нефрита связано с повреждением почек, возможно, это также указывает на отсутствие реабсорбции из почечных канальцев [17].

Согласно литературным данным, бальнеотерапия может эффективно применяться для снижения уровня сахара в крови. Сообщалось, что минеральные воды оказывают выраженное инсулинотропное действие в раннюю преабсорбционную фазу секреции инсулина [18]. В проведенном исследовании уровни глюкозы достоверно снижались к 21-м сут применения минеральной воды, что согласуется с приведенными выше исследователями.

К сожалению, литературных источников, описывающих изучение изменения газового состава крови при лечении нефрита минеральными водами, обнаружено не было. В данном исследовании после развития нефрита у мышей было зафиксировано значительное повышение уровней LACT, Cl^- и Na^+ ($p < 0,05$) с одновременным снижением уровней Ca^{2+} и K^+ . В процессе лечения уровни LACT, Cl^- и Na^+ снижались, а уровни Ca^{2+} и K^+ повышались. При этом отметили, что у животных экспериментальной группы эти изменения были более быстрыми и достоверными ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой. По сообщению L. Xu et al., нефрит связан с метаболическим ацидозом: снижаются уровни pH крови, HCO_3^- и pCO_2 , в то же время уровни Cl^- , Na^+ и LACT повышаются [19]. Сообщается, что минеральные воды с соответствующими свойствами благотворно влияют не только на почки и легкие, но и на печень, нормализуют кислотно-щелочной баланс в организме, способствуют утилизации лактата и регулируют обмен аминокислот [20]. К 21-м сут исследования показатели крови животных, употреблявших термальную минеральную воду, вернулись к физиологическому уровню, метаболический ацидоз скорректировался. L. Xu et al. также ранее сообщили о том, что у пациентов уровень LACT значительно скорректировался через 21 день после начала санаторно-курортного лечения [19].

В настоящем исследовании тяжелый гломерулонефрит был выявлен при гистопатологических исследованиях почечных биоптатов мышей с индуцированным нефритом на основании картины воспалительной инфильтрации в просвете сосудов (рис. 1). К концу исследования наблюдалось заметное улучшение у животных экспериментальной группы, получавших горячую термальную воду из источника Süreyu I (рис. 2). При этом было отмечено, что картина нефрита сохранялась у животных контрольной группы, получавших водопроводную воду. Эти данные доказывают, что минеральная вода из горячего источника Süreyu I эффективна при лечении нефрита, что подтверждается результатами гистопатологического анализа, а также при клиническом, гематологическом, биохимическом исследовании крови и анализе ее газового состава.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 1–4, 7–20 см. REFERENCES)

5. Карпухин М. В., Ли А. А., Гусев М. Е. Восстановительная терапия урологических и андрологических больных на курортах Европы. 4-е изд. М.: Интел Принт; 2003. 144 с.
6. Рудиченко Е. В., Гвозденко Т. А., Антонюк М. В. Комплексное восстановительное лечение больных хроническим пиелонефритом. Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. 2006; 3: 16–19. eLIBRARY ID: 9199323.

REFERENCES

1. Miller P. D. Chronic kidney disease and the skeleton. *Bone Res.* 2014; 2:14044. DOI: 10.1038/boneres.2014.44.
2. Kahl C. R., Falk R. J. Glomerulonephritis and Interstitial Nephritis. In: Vincent J.-L., Abraham E., Kochanek P., Moore F., Fink M. *Textbook of Critical Care*. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2011; 913–917.
3. Maharaj S. V. M., Orem W. H., Tatu C. A., Lerch H. E. 3rd, Szilagyi D. N. Organic compounds in water extracts of coal: links to Balkan endemic nephropathy. *Environ. Geochem. Health.* 2014; 36 (1): 1–17. DOI: 10.1007/s10653-013-9515-1.
4. Nocco P. B. Mineralwasser als Heilmittel [Mineral water as a cure]. *Veroff. Schweiz. Ges. Gesch. Pharm.* 2008; 29:13–402. PMID: 19230311. (in German)
5. Karpuhin M. V., Li A. A., Gusev M. E. Rehabilitation therapy of urologic and andrologic patients in European health resorts [Vosstanovitel'naya terapiya urologicheskikh i andrologicheskikh bol'nykh na kurortah Evropy]. 4th ed. M.: Intel Print; 2003. 144 p. (in Russian)
6. Rudichenko E. V., Gvozdenko T. A., Antonyuk M. V. Combined rehabilitation of patients with chronic pyelonephritis. *Problems of Balneology, Physiotherapy, and Exercise Therapy [Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoi fizicheskoi kul'tury]*. 2006; 3: 16–19. eLIBRARY ID: 9199323. (in Russian)
7. Rodgers A. L. Effect of mineral water containing calcium and magnesium on calcium oxalate urolithiasis risk factors. *Urol. Int.* 1997; 58 (2): 93–99. DOI: 10.1159/000282958.
8. Siener R., Jahnen A., Hesse A. Influence of a mineral water rich in calcium, magnesium and bicarbonate on urine composition and the risk of calcium oxalate crystallization. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2004; 58 (2): 270–276. DOI: 10.1038/sj.ejcn.1601778.
9. Tani T., Orimo H., Shimizu A., Tsuruoka S. Development of a novel chronic kidney disease mouse model to evaluate the progression of hyperphosphatemia and associated mineral bone disease. *Sci. Rep.* 2017; 7 (1): 2233. DOI: 10.1038/s41598-017-02351-6.
10. Suckow M. A., Danneman P. J., Brayton C. *The Laboratory Mouse*. CRC Press; 2000. 184 p. DOI: 10.1201/9780849376276.
11. Lange U., Müller-Ladner U., Schmidt K. L. Balneotherapy in rheumatic diseases – an overview of novel and known aspects. *Rheumatol. Int.* 2006; 26 (6): 497–499. DOI: 10.1007/s00296-005-0019-x.
12. Greco-Otto P., Bond S., Sides R., Kwong G. P. S., Bayly W., Leguillette R. Workload of horses on a water treadmill: effect of speed and water height on oxygen consumption and cardiorespiratory parameters. *BMC Vet. Res.* 2017; 13 (1):360. DOI: 10.1186/s12917-017-1290-2.
13. Agishi Y. Hot springs and the physiological functions of humans. *Asian Med. J.* 1995; 38: 115–124.
14. Sukuken S., Abu-Shakra M., Flusser D. Balneotherapy in autoimmune diseases. *Isr. J. Med. Sci.* 1997; 33 (4): 258–261. PMID: 9347875.

15. Rahman A., Yamazaki D., Sufiun A., Kitada K., Hitomi H., Nakano D., Nishiyama A. A novel approach to adenine-induced chronic kidney disease associated anemia in rodents. *PLoS One*. 2018; 13 (2):e0192531. DOI: 10.1371/journal.pone.0192531.

16. Pereira C. D., Severo M., Neves D., Ascensão A., Magalhães J., Guimarães J. T., et al. Natural mineral-rich water ingestion improves hepatic and fat glucocorticoid-signaling and increases sirtuin 1 in an animal model of metabolic syndrome. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 2015; 21 (2): 149–157. DOI: 10.1515/hmbci-2014-0032.

17. Gorriz J. L., Martinez-Castelao A. Proteinuria: detection and role in native renal disease progression. *Transplant. Rev. (Orlando)*. 2012; 26 (1): 3–13. DOI: 10.1016/j.trre.2011.10.002.

18. Lee K. S., Kwon Y. S., Kim S., Moon D. S., Kim H. J., Nam K. S. Regulatory mechanism of mineral-balanced deep sea water on hypocholesterolemic

effects in HepG2 hepatic cells. *Biomed. Pharmacother.* 2017; 86: 405–413. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.12.046.

19. Xu L., Wu L., Liu T., Xing W., Cao X., Zhang S., Su Z. Effect of a 21-day balneotherapy program on blood cell counts, ponogen levels, and blood biochemical indexes in servicemen in sub-health condition. *J. Phys. Ther. Sci.* 2017; 29 (9): 1573–1577. DOI: 10.1589/jpts.29.1573.

20. Halperin M. L., Hammeke M., Josse R. G., Jungas R. L. Metabolic acidosis in the alcoholic: a pathophysiologic approach. *Metabolism*. 1983; 32 (3): 308–315. DOI: 10.1016/0026-0495(83)90197-x.

Поступила 31.08.2020

Принята в печать 16.10.2020

Received on 31.08.2020

Approved for publication on 16.10.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Bülent Elitok, доцент, доктор наук, кафедра терапии, факультет ветеринарной медицины, Университет Афьон Коджатеппе, г. Афьонкарахисар, Турция.

Agilonu Yasin, Турция.

Yavuz Ulusoy, доктор наук, заведующий лабораторией патологии, Центральный научно-исследовательский институт ветеринарного контроля, Министерство сельского и лесного хозяйства, г. Анкара, Турция.

Bahadır Kiliç, ветеринарный врач лаборатории патологии, Центральный научно-исследовательский институт ветеринарного контроля, Министерство сельского и лесного хозяйства, г. Анкара, Турция.

Bülent Elitok, Associate Professor, Doctor of Science, Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, Afyonkarahisar, Turkey.

Agilonu Yasin, Turkey.

Yavuz Ulusoy, Doctor of Science, Head of Pathology Laboratory, Veterinary Control Central Research Institute, Ministry of Agriculture and Forestry, Ankara, Turkey.

Bahadır Kiliç, Veterinarian, Pathology Laboratory, Veterinary Control Central Research Institute, Ministry of Agriculture and Forestry, Ankara, Turkey.

DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-322-323

Рецензия на монографию «Африканская чума свиней в условиях особо охраняемых природных территорий (опыт Воронежского заповедника)».

Б. В. Ромашов, Н. Б. Ромашова, Е. А. Стародубцева, А. С. Мишин.

Воронеж: Издательско-полиграфический центр «Научная книга», 2019. 120 с.

ISBN 978-5-4446-1236-1

В. В. Макаров

Доктор биологических наук, профессор, ФГАУ ВО «Российский университет дружбы народов», г. Москва, Россия

Для цитирования: Макаров В. В. Рецензия на монографию «Африканская чума свиней в условиях особо охраняемых природных территорий (опыт Воронежского заповедника)». Б. В. Ромашов, Н. Б. Ромашова, Е. А. Стародубцева, А. С. Мишин. Воронеж: Издательско-полиграфический центр «Научная книга», 2019. 120 с. ISBN 978-5-4446-1236-1. *Ветеринария сегодня*. 2020; 4 (35): 322–323. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-322-323.

Peer-review of monograph “African swine fever in strict nature reserves (case study of Voronezh nature reserve)”.

B. V. Romashov, N. B. Romashova, E. A. Starodubtseva, A. S. Mishin.

Voronezh: Publishing and polygraphic center “Science Book”, 2019. 120 p.

ISBN 978-5-4446-1236-1

V. V. Makarov

Doctor of Science (Biology), Professor, RUDN University, Moscow, Russia

For citation: Makarov V. V. Peer-review of monograph “African swine fever in strict nature reserves (case study of Voronezh nature reserve)”. B. V. Romashov, N. B. Romashova, E. A. Starodubtseva, A. S. Mishin. Voronezh: Publishing and polygraphic center “Science Book”, 2019. 120 p. ISBN 978-5-4446-1236-1. *Veterinary Science Today*. 2020; 4 (35): 322–323. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-322-323.

Эпизоотическая обстановка по африканской чуме свиней (АЧС) на территории РФ и тренды в течение всего периода неблагополучия стабильно характеризуются «положительной» динамикой развития как в домашнем свиноводстве, так и в дикой природе среди кабанов в достаточно близком соотношении 1,5:1, что однозначно свидетельствует о необходимости безотлагательного изменения отношения к проблеме и радикальных решений. В контроле домашнего цикла инфекции, хотя и безотносительно к желаемой эффективности, реализуются вполне четко прописанные мероприятия согласно ранее действовавшей инструкции от 1980 г. и затем правилам, утвержденным в 2016 г. Что касается природного сегмента, то здесь на протяжении уже многих лет сложилось некое противоречие вплоть до конфронтации биологов, охотоведов, природоохранных ведомств и прочих зоозащитных организаций с государственными службами, обязанными проводить противоэпизоотические мероприятия. При этом со стороны первых – полное непонимание законов эпизоотологии и паразитизма, категорическое неприятие всего, что исходит от ветеринарии, и обвинение ветеринарных служб во всех неурядицах, дема-

гогия, отсутствие элементарной аргументации, что подхватывается всегда падкими на сенсации СМИ и даже некоторыми научными изданиями.

К сожалению, эпизоотологической проработке столь актуальной проблемы «кабан – АЧС» в отечественной литературе посвящено буквально 3–4 авторитетных научных публикации, что в количественном плане серьезно уступает амбициозной печатной продукции оппозиции. Выход в свет монографии Б. В. Ромашова и соавторов в этом отношении просто подарок, весьма своевременный. Не вдаваясь в пересказ ее содержания, достаточно отметить наиболее значимые, по мнению рецензента, общие и частные положения издания.

Как и полагается в подобных случаях, в качестве первичных, исходных данных эпизоотологического анализа подробно освещены общестатистические сведения и особенности исследуемого объекта – крупной изолированной группировки кабанов, которая во многом соответствует требованиям идеальной (панмиктической) популяции. Авторский коллектив представляет действительно научный и практический опыт реальной работы специалистов с АЧС в полевых условиях, кото-

рый, без преувеличения, по значимости (разумеется, не по масштабам) можно сравнить с опытом ликвидации заболевания в 1977 г. в трех областях СССР.

Это связано с уникальностью эпизоотического явления – самого по себе факта полного естественного цикла развития масштабной эпизоотической волны от начала до фатального конца в замкнутой локальной паразитарной системе без вмешательства извне (вакцинации, как известно, нет, окончательный диагноз поставлен практически *post factum*). Суть в том, что в 2016 г. в течение 5 месяцев (март – июль) на территории Воронежского заповедника площадью 32 тыс. га в результате заноса и распространения АЧС произошла тотальная гибель кабанов. Их исходная численность составляла 532 особи, усредненная плотность популяции – 16,6 особи на 1000 га, животные активно пользовались подкормочными площадками, держались в пойменных участках внутри заповедника. Развитие ситуации характеризовалось типичной эпизоотической кривой. Результаты этого уникального исследования, объективно документированного и опубликованного, могут служить образцом характеристики природной эпизоотии АЧС.

Даже первичное знакомство с изданием наводит на целый ряд размышлений, вопросов, возражений в лучшем смысле этого определения. Вот лишь некоторые из них.

В порядке дискуссии нельзя согласиться с выводом авторов о невозможности устойчивой циркуляции АЧС в природе среди кабанов из-за высокой вирулентности возбудителя и их второстепенной роли в эпизоотологии АЧС (стр. 4, 16, 17 и далее). Действительно, инцидентность природной инфекции, регистрируемой в РФ, имеет в основном спорадический характер, без очевидной временной и пространственной непрерывности, хотя в настоящее время ветеринарные специалисты не склонны считать достоверными данные, предоставляемые органами охотоведения. Но в неблагополучных по АЧС странах Центральной Европы, при относительно высокой популяционной плотности кабанов, положение с самого начала диаметрально противоположно: вся эндемичность обусловлена именно их заболеваемостью в природных условиях с редкими, также спорадическими индекс-случаями у домашних свиней в соотношении 9:1 и доказанными признаками эволюции в сторону по крайней мере хронизации болезни и умеренной вирулентности вируса II генотипа (см., например, в источнике: <https://doi.org/10.1186/s40813-018-0109-2>).

На основании буквально потока зарубежных аналитических публикаций факт, что кабан является единственным резервуаром инфекции, даже не обсуждается. Не являются проблемой и редкие случаи вовлечения в эпизоотический процесс домашних свиней. Трудно представить, чтобы при таком паттерне эпизоотического процесса какую-то роль может играть пресловутый человеческий фактор. И именно практически полная ликвидация кабанов (на 97,5%) в Литве позволила не допустить распространения АЧС в республике в 2014–2017 гг. по сравнению с Латвией и особенно Эстонией, проигнорировавшими депопуляцию кабанов в нужное время.

То же касается явно преждевременного заключения, что «на территории РФ отсутствуют биологические и экологические предпосылки формирования активно циркулирующих очагов АЧС» (стр. 99). Чем тогда объ-

яснить, что в 2019 г. возникли четко определенные хронологически и пространственно, эндемически стабильные, по крайней мере в течение года, кластеры природной инфекции с явными признаками природной очаговости в Новгородской, Нижегородской и Орловской областях РФ со спорадическими индекс-вспышками в домашних хозяйствах?

Впервые в литературе по АЧС говорится о возможной судьбе заболевших кабанов, в частности, подчеркивается утрата миграционного инстинкта. Для контроля природной инфекции было бы важно, располагая таким масштабом смертности, также иметь достоверную информацию о преимущественных природных условиях, которые жертвы инфекции выбирают для своей гибели (некоторые данные об этом уже есть в зарубежных публикациях).

Кроме единственного упоминания о том, что кабаны заражаются АЧС от выброшенных трупов павших домашних свиней, не раскрыт, хотя бы гипотетически, вектор «домашний очаг → фауна». В заключении авторами для этого использовано понятие «антропопрессия» – абстрактный паразитологический термин, по-видимому, виртуального характера. Без этого все рассуждения об эпизоотологической «безвредности» кабанов – просто схоластика.

Остается непонятным распространенный и как бы само собой разумеющийся эвфемизм, что «кабан является одним из важнейших компонентов фауны и биоразнообразия». Как же было с этим до середины прошлого века, когда на территории СССР, за редким исключением юга страны, кабана не было вовсе? Какую конкретно пользу принесло последующее распространение кабана по всей стране? И как это понимать, если на территории РФ кабан признается как инвазивный, т. е. экологически вредный вид, а согласно такому серьезному документу, как «Агроэкологический атлас России и сопредельных стран», обозначен как промысловое животное и вредитель сельскохозяйственных культур (для иллюстрации рекомендуется видео: <https://www.youtube.com/watch?v=1iCePTe178w>).

В тексте встречаются отдельные редакционные издержки. Например, при описании вируса АЧС: ДНК находится не внутри суперкапсидной оболочки, а внутри капсида. Термин «летучесть» вируса некорректен – АЧС воздушным путем не передается. Список источников крайне ограничен, в основном это отечественные авторы, в то время как существует обширная литература по результатам исследований эпизоотологии АЧС в странах Прибалтики и Польши с серьезными выводами.

Все вышеизложенное следует воспринимать как мнение рецензента, в то же время с благодарностью отмечающего многократное и нередко критическое использование в монографии собственных публикаций.

В целом же книга Б. В. Ромашова и соавторов как научный труд соответствует современным стандартам, удачно скомпонована, написана хорошим языком. Положительным является подробная иллюстративная ее часть.

Работа действительно уникальна, насыщена фактами, новыми для науки и практики в общем и частном эпизоотологическом контексте. Их бесценный опыт заслуживает внимания всех, кто работает в области ветеринарной эпидемиологии и ветеринарного образования, изучает природную очаговость и эмерджентность инфекций.

Публикации сотрудников ФГБУ «ВНИИЗЖ» в зарубежных научных журналах за 2018–2020 гг., включенных в международные реферативные базы данных и системы цитирования.

Тема: «Заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота»

Publications of the FGBI "ARRIAH" researchers in foreign journals included in the abstract and citation databases, 2018–2020.

Subject: "Lumpy skin disease"

1. Pestova Y., Byadovskaya O., Kononov A., Sprygin A. A real time high-resolution melting PCR assay for detection and differentiation among sheep pox virus, goat pox virus, field and vaccine strains of lumpy skin disease virus. *Mol. Cell. Probes*. 2018; 41: 57–60. DOI: 10.1016/j.mcp.2018.08.003.
2. Sprygin A., Babin Y., Pestova Y., Kononova S., Wallace D. B., Van Schalkwyk A., Byadovskaya O., Diev V., Lozovoy D., Kononov A. Analysis and insights into recombination signals in lumpy skin disease virus recovered in the field. *PLoS One*. 2018; 13 (12):e0207480. DOI: 10.1371/journal.pone.0207480.
3. Sprygin A., Pestova Y., Prutnikov P., Kononov A. Detection of vaccine-like lumpy skin disease virus in cattle and *Musca domestica* L. flies in an outbreak of lumpy skin disease in Russia in 2017. *Transbound. Emerg. Dis.* 2018; 65 (5): 1137–1144. DOI: 10.1111/tbed.12897.
4. Sprygin A., Artyuchova E., Babin Y., Prutnikov P., Kostrova E., Byadovskaya O., Kononov A. Epidemiological characterization of lumpy skin disease outbreaks in Russia in 2016. *Transbound. Emerg. Dis.* 2018; 65 (6): 1514–1521. DOI: 10.1111/tbed.12889.
5. Kononov A., Prutnikov P., Shumilova I., Kononova S., Nesterov A., Byadovskaya O., Pestova Y., Diev V., Sprygin A. Determination of lumpy skin disease virus in bovine meat and offal products following experimental infection. *Transbound. Emerg. Dis.* 2019; 66 (3): 1332–1340. DOI: 10.1111/tbed.13158.
6. Sprygin A., Babin Y., Pestova A., Kononova S., Byadovskaya A., Kononov A. Complete genome sequence of the lumpy skin disease virus recovered from the first outbreak in the Northern Caucasus Region of Russia in 2015. *Microbiol. Resour. Announc.* 2019; 8 (8):e01733-18. DOI: 10.1128/MRA.01733-18.
7. Kononov A., Byadovskaya O., Kononova S., Yashin R., Zinyakov N., Mischenko V., Perevozchikova N., Sprygin A. Detection of vaccine-like strains of lumpy skin disease virus in outbreaks in Russia in 2017. *Arch. Virol.* 2019; 164 (6): 1575–1585. DOI: 10.1007/s00705-019-04229-6.
8. Sprygin A., Pestova Y., Wallace D. B., Tuppurainen E., Kononov A. V. Transmission of lumpy skin disease: A short review. *Virus Res.* 2019; 269:197637. DOI: 10.1016/j.virusres.2019.05.015.
9. Sprygin A., Byadovskaya O., Kononova S., Zakharov V., Pestova Y., Prutnikov P., Kononov A. A real-time PCR screening assay for the universal detection of lumpy skin disease virus DNA. *BMC Res. Notes*. 2019; 12 (1):371. DOI: 10.1186/s13104-019-4412-z.
10. Kononov A., Prutnikov P., Byadovskaya O., Kononova S., Rusaleev V., Pestova Y., Sprygin A. Emergence of a new lumpy skin disease virus variant in Kurgan Oblast, Russia, in 2018. *Arch. Virol.* 2020; 165 (6): 1343–1356. DOI: 10.1007/s00705-020-04607-5.
11. Kononov A., Byadovskaya O., Wallace D., Prutnikov P., Pestova Y., Kononova S., Nesterov A., Rusaleev V., Lozovoy D., Sprygin A. Non-vector-borne transmission of lumpy skin disease virus. *Sci. Rep.* 2020; 10 (1):7436. DOI: 10.1038/s41598-020-64029-w.
12. Kononova S., Kononov A., Shumilova I., Byadovskaya O., Nesterov A., Prutnikov P., Babiuk S., Sprygin A. A lumpy skin disease virus which underwent a recombination event demonstrates more aggressive growth in primary cells and cattle than the classical field isolate. *Transbound. Emerg. Dis.* DOI: 10.1111/tbed.13798.
13. Sprygin A., Pestova Y., Byadovskaya O., Prutnikov P., Zinyakov N., Kononova S., Ruchnova O., Lozovoy D., Chvala I., Kononov A. Evidence of recombination of vaccine strains of lumpy skin disease virus with field strains, causing disease. *PLoS One*. 2020; 15 (5):e0232584. DOI: 10.1371/journal.pone.0232584.
14. Sprygin A., Van Schalkwyk A., Shumilova I., Nesterov A., Kononova S., Prutnikov P., Byadovskaya O., Kononov A. Full-length genome characterization of a novel recombinant vaccine-like lumpy skin disease virus strain detected during the climatic winter in Russia, 2019. *Arch. Virol.* 2020; 165 (11): 2675–2677. DOI: 10.1007/s00705-020-04756-7.

ЗДЕСЬ МОЖЕТ БЫТЬ ВАША СТАТЬЯ!

Журнал «Ветеринария сегодня» приглашает авторов для публикации своих научных работ

- Редакция «Ветеринарии сегодня» (<http://veterinary.arriah.ru/jour/index>) рассмотрит возможность публикации ваших научных статей на страницах журнала. Наша миссия – представление основных направлений развития ветеринарной науки, привлечение внимания мировых научных сообществ к актуальным проблемам и инновационным разработкам в области ветеринарии, формирование и развитие единого мирового научного знания.
- Мы публикуем статьи как выдающихся деятелей науки, так и молодых ученых, специалистов-практиков, работников ветеринарных учреждений для обмена опытом, обеспечения устойчивого ветеринарного благополучия и новых научных дискуссий.
- Журнал основан в 2012 г. на базе ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ВНИИЗЖ). Статьи публикуются на двух языках: русском и английском. Основными направлениями являются результаты теоретических и экспериментальных исследований в области ветеринарии и ветеринарной микробиологии, тенденций развития ветеринарной науки, обсуждение актуальных вопросов в области мониторинга и эпизоотологии болезней животных. Журнал распространяется по всей территории России, а также в крупнейших мировых научных центрах.

ЗАДАЧИ ЖУРНАЛА



Изучение основных тенденций развития ветеринарной науки



Анализ широкого круга передовых технологий в области мониторинга и эпизоотологии болезней животных, представление результатов теоретических и экспериментальных исследований в данной области



Обсуждение актуальных вопросов ветеринарии

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫМ СТАТЬЯМ

- К публикации принимаются статьи на двух языках – русском и английском, – содержащие результаты собственных научных исследований, объемом до 6–8 страниц (до 10 страниц – для обзора) – но не менее 5 (при одинарном интервале и размере шрифта 12 пт). Оптимальный объем статьи: **3000–6000 слов**.

Предоставление в редакцию рукописи статей является подтверждением согласия автора на использование его произведения как в бумажном, так и в электронном виде. Авторы несут ответственность за полноту и достоверность цитируемой в их работах литературы, а также за публикацию заимствованного материала без ссылки на источник. Материалы направляются в редакцию с сопроводительным письмом от организации автора (форма на сайте).

СТРУКТУРА ПРЕДСТАВЛЯЕМОЙ СТАТЬИ

1. **УДК**
2. **Название статьи**
3. Имя, отчество, фамилия авторов, место работы авторов, город, страна, ORCID ID, адрес электронной почты.
4. **Резюме** (краткое точное изложение содержания статьи, включающее фактические сведения и выводы описываемой работы): 200–250 слов, но не более 2000 знаков.
5. **Ключевые слова** (5–6 слов, словосочетаний), наиболее точно отображающие специфику статьи.
6. **Благодарности** (при наличии данных о благодарности людям и финансировании исследований).
7. **Для цитирования**
8. **Конфликт интересов**
9. **Для корреспонденции** (фамилия, имя, отчество (полностью), ученая степень, научное звание, должность, адрес, электронная почта).
10. **Введение**
11. **Материалы и методы**
12. **Результаты и обсуждение**
13. **Выводы или заключение**
14. **Список литературы** (ванкуверский стиль – расположение источников в порядке их цитирования (появления в тексте)).
15. **Информация об авторах** (фамилия, имя, отчество (полностью), ученая степень, научное звание, должность, город, страна).
16. К размещению принимаются иллюстрированные материалы (фото, графики) хорошей контрастности, с разрешением не ниже 300 точек на дюйм (300 dpi), оригиналы прикладываются к статье отдельными файлами в формате .tif или .jpg (рисунки, не соответствующие требованиям, будут исключены из статей, поскольку достойное их воспроизведение типографским способом невозможно).

Работа должна быть представлена в редакторе WORD, формат DOC, шрифт Times New Roman, размер шрифта – 12 пт, межстрочный интервал – одинарный, размер полей – по 2 см, отступ в начале абзаца – 1 см, форматирование по ширине.

Рисунки, таблицы, схемы, графики и пр. должны быть обязательно пронумерованы, иметь источники и уместаться в печатное поле страницы. Название таблицы – над таблицей; название рисунка/графика – под рисунком/графиком.

Оригиналы и копии присланных статей не возвращаются. Авторы должны гарантировать, что поданный материал не был ранее опубликован. Важным условием для принятия статей в журнал «Ветеринария сегодня» является выполнение всех вышеперечисленных требований редакции.

ПОДРОБНЕЕ ОБ УСЛОВИЯХ ПУБЛИКАЦИИ СТАТЕЙ ВЫ МОЖЕТЕ УЗНАТЬ В НАШЕЙ РЕДАКЦИИ

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

Телефоны: +7 (4922) 26-15-12, 26-17-65, 26-19-88, доб. 22-27

Контактное лицо: Никешина Татьяна Борисовна, e-mail: nikeshina@arriah.ru

«Ветеринария сегодня» – это прекрасная возможность заявить о себе миру!



ФГБУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ
ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»
FGBI "FEDERAL CENTRE FOR ANIMAL HEALTH" (FGBI "ARRIAH")

РЕГИОНАЛЬНАЯ РЕФЕРЕНТНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ МЭБ ПО ЯЩУРУ

OIE REGIONAL REFERENCE LABORATORY
FOR FOOT AND MOUTH DISEASE

РЕФЕРЕНТНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ МЭБ ПО ВЫСОКОПАТОГЕННОМУ И НИЗКОПАТОГЕННОМУ ГРИППУ ПТИЦ И НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ

OIE REFERENCE LABORATORY FOR HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA
AND LOW PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA (POULTRY) AND NEWCASTLE DISEASE

ФГБУ «ВНИИЗЖ» производит вакцину против пастереллеза крупного рогатого скота инактивированную эмульсионную



Вакцина изготовлена из инактивированной суспензии штаммов бактериальных клеток *Mannheimia haemolytica* серотипа A:1, *Pasteurella multocida* серогруппы A, аналейкотоксина *Mannheimia haemolytica* с добавлением масляного адъюванта Montanide (SEPPIC, Франция). Компонентный состав вакцины, не имеющей аналогов на отечественном рынке лекарственных средств для ветеринарного применения, подобран с учетом циркулирующих в Российской Федерации серовариантов бактерий – возбудителей пастереллеза у крупного рогатого скота и дополнен аналейкотоксином, который играет две ведущие роли в развитии инфекционного процесса, первая из которых – защитная функция бактериальной клетки путем разрушения лейкоцитов, вторая роль заключается в высвобождении нейтрофильных веществ, приводящих к повреждению легочных тканей.

В ходе доклинических и клинических исследований разработанной вакцины против пастереллеза крупного рогатого скота инактивированной эмульсионной (проводимых согласно требованиям Федерального закона № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» и в соответствии с рекомендациями МЭБ) были подтверждены ее безвредность и эффективность. Высокая степень защиты иммунизированного поголовья от пастереллеза была показана в условиях животноводческих хозяйств Российской Федерации.

В настоящее время респираторная патология молодняка крупного рогатого скота остается одной из наиболее актуальных и экономически значимых проблем ветеринарии. Пастереллез является широко распространенной инфекционной болезнью, лечение которой – сложное, дорогостоящее и не всегда успешное мероприятие. Это обусловлено широким распространением антибиотикорезистентных штаммов *Mannheimia haemolytica* и *Pasteurella multocida*, а также трудностями в достижении необходимой ингибирующей концентрации антибактериального препарата в легких, поэтому основным звеном в системе мер профилактики и борьбы с пастереллезом является вакцинация.

В неблагополучных хозяйствах телят рекомендуется вакцинировать с 10-суточного возраста двукратно с интервалом 3–4 недели. В угрожаемых по пастереллезу хозяйствах, а также при вероятности возникновения заболевания при перевозке, вводе в другое стадо, смене помещений животных прививают однократно за 3 недели до предполагаемого риска. Вакцину вводят внутримышечно в области средней трети шеи в объеме одной дозы, которая составляет 1,0 см³.

**По вопросам приобретения ветеринарных препаратов
обращаться в ФГБУ «ВНИИЗЖ» по телефонам:
8 (4922) 52-99-24, 8 (4922) 26-15-25.**