

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

ОГЛАВЛЕНИЕ

Главный редактор

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

Технический редактор

Волхонская М. В.
e-mail: invetbio@yandex.ru

Редакционный совет

Алиев А. А.,
проф., докт. вет. наук

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

Белова Л. М.,
проф., докт. биол. наук

Васильев Д. Б.,
докт. вет. наук

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

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

Кузьмин В. А.
проф., докт. вет. наук

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

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

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

Яшин А. В.,
проф., докт. вет. наук

По вопросам размещения
рекламы обращайтесь
к Марии Волхонской
по тел. (812) 232-55-92,
8 (921) 095-89-27,
e-mail: invetbio@yandex.ru

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

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

ФИЗИОЛОГИЯ

Мармарян Г. Ю., Камалян Р. Г.
Молочная продуктивность и ряд биохимических тестов молока чистопородных
и помесных коз, разводимых в Армении (за 3-й лактационный период) 3

Шпакова Н. М., Нипот Е. Е., Орлова Н. В.
Влияние хлорида ртуты на развитие гипотонического гемолиза эритроцитов
млекопитающих 8

МИКРОБИОЛОГИЯ

Климентова Е. Г.
Антагонистическая активность гемолитических *Escherichia coli*, выделенных
из толстой кишки мышей с экспериментальным дисбактериозом, обусловленным
действием δ -эндотоксина *Bacillus thuringiensis* 13

ИММУНОЛОГИЯ

**Шахов А. Г., Федосов Д. В., Сашнина Л. Ю., Масьянов Ю. Н., Алехин Ю. Н.,
Сидельникова И. Р.**
Влияние иммунного статуса на возникновение и развитие респираторных болезней
у телят в условиях специализированных хозяйств 19

ВИРУСОЛОГИЯ

**Жилин Е. С., Русанова А. М., Червякова О. В., Зайцев В. Л., Кошеметов Ж. К.,
Булатов Е. А.**
Выделение, идентификация и изучение некоторых биологических свойств вируса
оспы мышей 26

Матвеева В. М., Кошеметов Ж. К., Бурабаев А. А., Нурабаев С. Ш.
Получение антисывороток к вирусу гриппа лошадей для серологической
диагностики и идентификации возбудителя 32

ЭПИЗООТОЛОГИЯ

Дягилев Г. Т., Неустроев М. П.
История организации профилактических и противоэпизоотических мероприятий
против сибирской язвы на территории Республики Саха (Якутия) 37

Кудряшов А. А., Яшина В. Г.
Случаи бешенства диких и домашних животных в Ленинградской области в 1989 году 43

**Табынов К. К., Кыдырбаев Ж. К., Сансызбай А. Р., Рыскельдинова Ш. Ж.,
Асанжанова Н. Н., Кожамкулов Е. М., Инкарбеков Д. А.**
Экспериментальное изучение безвредности и иммуногенности холодоадаптированного
реассортантного штамма А/НК/ОТАР/6:2/2010 вируса гриппа на лошадях 47

Тупота Н. Л., Ионина С. В., Терновой В. А., Тупота С. Г., Донченко Н. А.
Изучение *Mycobacterium arupense*, выделенного на территории Сибирского региона 56

ПАРАЗИТОЛОГИЯ

**Коняев С. В., Янагида Т., Кривопапов А. В., Дупал Т. А., Абрамов С. А.,
Накао М., Сако Я., Гуляев В. Д., Ито А.**
Генотипическая характеристика возбудителя альвеолярного эхинококкоза (*Echinococcus
multilocularis*) в Западной Сибири 61

ОФТАЛЬМОЛОГИЯ

Павлова Т. Н.
Сквозная и послойная кератопластика с применением лиофилизированного
донорского трансплантата у мелких домашних животных 68

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Алексеев В. А., Андриевская Е. М., Труханова И. С.
Методика реабилитации щенков серого тюленя и кольчатой нерпы 72

СОБЫТИЯ 86

Издательство Института Ветеринарной Биологии

Адрес редакции/издателя: 197198, С.-Петербург, ул. Ораниенбаумская, д. 3-Б. Тел. (812) 232-55-92, тел./факс 232-88-61. E-mail: virclin@mail.ru. Сайт: www.invetbio.spb.ru

Подписано в печать 17.09.2012. Дата выхода: 20.09.2012. Отпечатано в типографии ООО «Агентство ИНФО ОЛ»: 197101, Санкт-Петербург, ул. Рентгена, д. 1.

Тираж 1000 экз. Свободная цена. Подписной индекс в каталоге «Газеты. Журналы» – 33184, «Пресса России» – 29447, «Почта России» – 11354.

Ответственность за достоверность представленных в статьях данных несут авторы. Все рекламируемые товары и услуги имеют соответствующие сертификаты.

За содержание рекламных объявлений редакция ответственности не несет.

© Институт Ветеринарной Биологии, Санкт-Петербург, 2012

The journal is registered by Federal Service for Supervision in the Sphere of Communications, Information Technologies and Mass Communications. The certificate on registration of mass media ПИ № ФЦ77-36472 of June 3, 2009. The journal is included in the list of the leading peer-reviewed journals and publications of State Commission for Academic Degrees and Titles of the RF Ministry of Education and Science

CONTENTS

Editor-in-Chief

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

Technical Editor

Volkhonskaya M. V.
e-mail: invetbio@yandex.ru

Editorial Board

Aliiev A. A.,
Doctor of Science, Professor

Andreeva N. L.,
Doctor of Science, Professor

Belova L. M.,
Doctor of Science, Professor

Kudryashov A. A.,
Doctor of Science, Professor

Kuzmin V. A.,
Doctor of Science, Professor

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

Prudnikov V. S.,
Doctor of Science, Professor

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

Vasilyev D. B.,
Doctor of Science

Voronin V. N.,
Doctor of Science, Professor

Yashin A. V.,
Doctor of Science, Professor

On the matters of advertisement
please contact
Maria Volkhonskaya
by tel. +7 (812) 232-55-92,
e-mail: invetbio@yandex.ru

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

The journal is based in 2009
Founder and Publisher: Institute of
Veterinary Biology, Non-Commercial
Educational Institution of Further
Education

PHYSIOLOGY

Marmaryan G. Yu., Kamalyan R. G.

Lactation Performance and the Battery of Biochemical Tests of Milk of Pure-Bred and Cross Breed Goats Being Raised in Armenia (within the 3^d lactation period) 3

Shpakova N. M., Nipot E. Ye., Orlova N. V.

Effect of Mercury Chloride on Development of Hypotonic Hemolysis of Mammalian Erythrocytes 8

MICROBIOLOGY

Klimentova E. G.

Antagonistic Activity of Hemolytic *Escherichia coli*, Isolated from the Colon of Mice with Experimental Dysbiosis Caused by the Action of δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* 13

IMMUNOLOGY

Shakhov A. G., Fedosov D. V., Sashnina L. Yu., Mas'yanov Yu. N., Alekhin Yu. N., Sidelnikova I. R.

The Effect of Immune Status on the Onset and Development of a Respiratory Disease in Calves at Specialized Farms 19

VIROLOGY

Zhilin E. S., Rusanova A. M., Chervyakova O. V., Zaitsev V. L., Koshemetov Zh. K., Bulatov Ye. A.

Isolation, Identification and Study of Some Biological Properties of the Mousepox Virus 26

Matveeva V. M., Koshemetov Zh. K., Burabaev A. A., Nurabaev S. Sh.

Obtaining of Antiserum for Serum Diagnosis and Identification of Equine Influenza Virus Agent 32

EPIZOOTOLOGY

Dyagilev G. T., Neustroev M. P.

The History of the Organization of Preventive and Anti-Epizootic Measures Against Anthrax in the Republic of Sakha (Yakutia) 37

Kudryashov A. A., Yashina V. G.

The Cases of Rabies in Wild and Domestic Animals in Leningrad Region in 1989 43

Tabynov K. K., Kydyrbayev Zh., Sansyzbay A. R., Ryskeldinova Sh. Zh.,

Assanzhanova N. N., Kozhamkulov Ye. M., Inkarebekov D. A.

Experimental Study of the Safety and Immunogenicity of Cold-Adapted Reassortant Strain A/HK/OTAR/6:2/2010 of Influenza Virus in Horses 47

Tupota N. L., Ionina S. V., Ternovoi V. A., Tupota S. G., Donchenko N. A.

The Study of *Mycobacterium arupense* Allocated Within the Territory of the Siberian Region 56

PARASITOLOGY

Konyaev S. V., Yanagida T., Krivopalov A. V., Dupal T. A., Abramov S. A., Nakao M., Sako Ya., Gulyaev V. D., Ito A.

Genotypic Characterization of the Causative Agent of Alveolar Echinococcosis (*Echinococcus multilocularis*) in Western Siberia 61

OPHTHALMOLOGY

Pavlova T. N.

Penetrating and Lamellar Keratoplasty with Application of a Freeze-Dried Donor Graft at Small Domestic Animals 68

METHODOLOGICAL RECOMMENDATIONS

Alekseev V. A., Andrievskaya E. M., Trukhanova I. S.

Ringed Seal and Grey Seal Pup Rehabilitation Methodology 72

EVENTS 86

Publishing of Institute of Veterinary Biology

Address of the editorial office/publisher: 197198, St.-Petersburg, Oranienbaumskaya st., 3-5. Tel. +7 (812) 232-55-92, fax: 232-88-61. E-mail: virclin@mail.ru. Site: invetbio.spb.ru

Signed for press on 17.09.2012. Issue date: 20.09.2012. Printed at printing house "Agency INFO OL": 197101, Russia, Saint-Petersburg, Rentgena st., 1. Circ. 1000 pc.

Free price. The subscription index in catalogues: "Gazety. Journaly" ("Newspapers. Magazines") – 33184, "Pressa Rossii" ("Russian Press") – 29447,

"Pochta Rossii" ("Russian Post") – 11354. The responsibility for reliability of the data presented in the articles is born by authors. Goods and services

advertised in this magazine are properly certified. Editorial staff is not responsible for the content of any advertisements.

© Institute of Veterinary Biology, Saint-Petersburg, 2012

УДК 636.39:577.1

Ключевые слова: коза, лизоцим, ксантиноксидаза, казеин, помеси

Key words: goat, lysozyme, xanthine oxidase, casein, cross breed

Мармарян Г. Ю., Камалян Р. Г.

**МОЛОЧНАЯ ПРОДУКТИВНОСТЬ И РЯД БИОХИМИЧЕСКИХ ТЕСТОВ МОЛОКА
ЧИСТОПОРОДНЫХ И ПОМЕСНЫХ КОЗ, РАЗВОДИМЫХ В АРМЕНИИ
(ЗА 3-Й ЛАКТАЦИОННЫЙ ПЕРИОД)
*LACTATION PERFORMANCE AND THE BATTERY OF BIOCHEMICAL TESTS OF MILK
OF PURE-BRED AND CROSS BREED GOATS BEING RAISED IN ARMENIA
(WITHIN THE 3rd LACTATION PERIOD)***

Государственный аграрный университет Армении. Адрес: 375009, Армения, г. Ереван, ул. Теряна, 74
Armenian State Agrarian University. Address: 375009, Armenia, Erevan, Teryana street, 74

Мармарян Гаяне Юрьевна, к. б. н., доцент
Marmaryan Gayaneh Yu., Ph.D., Associate Professor

Камалян Ромик Гургенович, д. б. н., проф.
Kamalyan Romik G., Doctor of Biology Science, Professor

Аннотация. Целью эксперимента явилось изучение молочной продуктивности завезенных в Армению высоко-молочных, местных, а также полученных от их скрещивания помесей трех поколений за 3-й период лактации. Изучали также некоторые биохимические тесты молока у всех выше указанных групп коз. Скрещивание завезенных коз с местными приводит к существенному повышению молочной продуктивности F_1 , F_2 и особенно F_3 помесей. Лизоцимная активность молока местных коз и помесей превышает таковую завезенных.

Summary. The goal of the research was to study lactation performance of the following groups of goats: good-milking goats imported into Armenia, local goats and the first, second and third cross progeny goats within the 3rd lactation period. Some biochemical tests of milk of all goats were also studied. Cross breeding of imported goats with local ones results in significant improvement of lactation performance of F_1 , F_2 and especially F_3 progeny. Lysozyme activity of milk of local goats and crossbreeds is higher than that of imported goats.

Введение

Местные породы коз, адаптированные к существованию в условиях высокогорья, не отличаются высокой молочной продуктивностью. Для повышения продуктивности местных коз была проведена многолетняя селекционная работа по скрещиванию местных и завезенных из США высокомо-лочных коз различных пород (альпийская, зааненская, тоггенбургская) в опытном козоводческом центре «АРИД» Ехегнадзора и в различных фермерских хозяйствах марзов РА (Сюникской, Гегаркуникской, Котайской, Вайоцдзорской). Многочисленные морфофизиологические и биохимические исследования выявили ряд различий между исследованными породами и их помесями. Из биохимических показателей крови к подобным различиям можно отнести содержание глутамина, обеспечивающего иммунные клетки углеродом, азотом и энергией [5, 6], активность ферментов, в частности аденозиндезаминазы, и содержания иммуноглобулинов [1, 2].

Помимо поддержания иммунного статуса перечисленные показатели характеризуют также интенсивность азотистого обмена и могут использоваться в оценке селекционной работы. Обнаруженные межпородные различия в показателях крови побудили нас изучить продуктивные качества и метаболические различия в функционально связанной с кровью сыворотке молока у коз, разводимых в козоводческом центре «АРИД».

Материал и методика

Моделью для исследований послужили козы, разводимые в козоводческом центре «АРИД» Ехегнадзорского региона РА. По принципу аналогов сформировали семь групп животных, из которых 3 высокомо-лочные завезенные породы (альпийская, зааненская, тоггенбургская – по 10 голов в каждой), местная (10 голов) и помеси трех разных поколений (F_1 , F_2 , F_3 – по 15 голов в каждой), полученные от скрещивания местных с завезенными. Таким образом, экспериментом

охвачено 85 козематок 4-летнего возраста. Пробы молока замораживали и перевозили в лабораторию, где выделяли сыворотку и проводили биохимические исследования.

Для определения лизоцимной активности [8] использовали суспензии *Micrococcus lysodeikticus* в 0,05М фосфатносолевом буфере pH 7,4. Измерение оптической плотности проводили при длине волны 450 нм.

Для выделения казеина и сывороточных белков [4] проводили электрофорез в полиакриламидном геле, с использованием 0,1М электродного буфера, pH 8,3. Окраску гелей проводили кумаси бриллиантовым синим G250.

Для определения железа в лактоферине использовали о-фенантролин, поглощение измеряли при длине волны 520 нм [7].

Ксантиноксидазную активность определяли по выходу мочевой кислоты ультрафиолетовым методом согласно конечной точке. Использовали 0,05М фосфатный буфер, pH 7,5, поглощение измеряли при длине волны 290 нм [9].

Результаты подвергнуты статистической обработке с использованием компьютерной программы Graph Pad [3].

Результаты исследований и обсуждение

Анализ молочной продуктивности изучаемых групп коз (табл. 1 и 2) свидетельствует о том, что характер изменения для всех идентичен и закономерен (рис. 1). Наиболее высокая молочная продуктивность за лактацию наблюдается у коз зааненской породы (609,9 л), козы альпийской породы по этому показателю уступают им на 10 %, а тоггенбургской – на 35,5 %. Наиболее низкая молочная продуктивность наблюдается у местных коз (206,7 л), что составляет лишь 33,9 % от зааненских. Молочная продуктивность помесей F₁, F₂, и F₃ носит промежуточный характер между местными и улучшающими породами, однако чем больше кровность улучшающих пород у помесей, тем выше молочная продуктивность последних. Так, если молочность местных козематок за лактацию принять за 100 %, то помеси первого поколения превышают их на 40,8 %, помеси второго и третьего поколений – соответственно

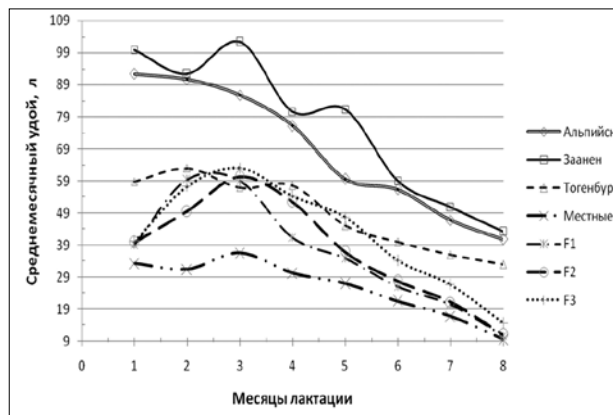


Рис. 1. Среднemesячный удой чистопородных, местных и помесных коз за 3-й лактационный период.

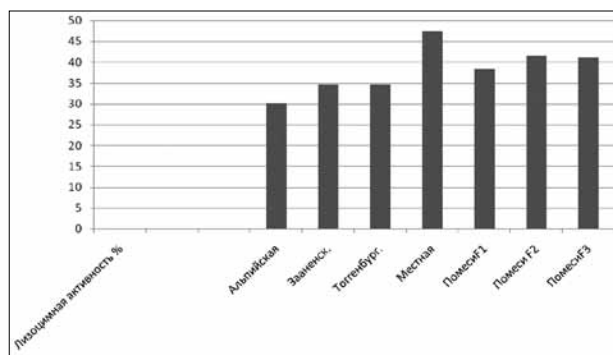


Рис. 2. Лизоцимная активность в молоке чистопородных, местных и помесных коз.

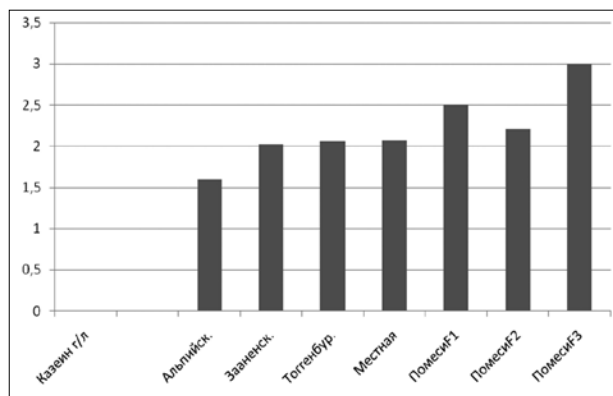


Рис. 3. Уровень казеина в молоке чистопородных, местных и помесных коз.

на 44,7 и 63,5 %. Следует отметить, что уже помеси третьего поколения имеют почти такую же молочную продуктивность, как и чистопородные козематки тоггенбургской породы, однако молочная продуктивность помесей F₃ составляет лишь 61,6 % таковой от альпийской и 55,4 % от зааненской пород. Несмотря на то, что скрещивание местных коз привело к существенному повышению молочности помесей, они значительно уступают альпийским и тем более зааненским козам.

Таблица 1.

Среднесуточная молочная продуктивность чистопородных, местных и помесных коз за 3-й лактационный период (контрольная дойка)

Породы и помеси (4-летние)	МЕСЯЦЫ							
	Март	Апрель	Май	Июнь	Июль	Август	Сентябрь	Октябрь
Альпийские	3,08±0,03	3,02±0,03	2,86±0,02	2,54±0,04	1,99±0,04	1,88±0,03	1,56±0,02	1,36±0,01
Зааненские	3,33±0,01	3,08±0,02	3,41±0,01	2,69±0,02	2,71±0,05	1,97±0,05	1,7±0,07	1,44±0,03
Тоггенбургские	1,96±0,07	2,1±0,09	1,9±0,09	1,92±0,1	1,50±0,06	1,33±0,06	1,20±0,07	1,1±0,06
Местные	1,11±0,08	1,05±0,09	1,22±0,09	1,01±0,08	0,9±0,07	0,72±0,05	0,56±0,06	0,32±0,03
Помеси F ₁	1,3±0,19	1,98±0,16	1,97±0,16	1,38±0,12	1,16±0,1	0,87±0,09	0,68±0,07	0,36±0,03
Помеси F ₂	1,33±0,09	1,65±0,14	2,01±0,12	1,75±0,14	1,23±0,09	0,93±0,06	0,71±0,06	0,37±0,03
Помеси F ₃	1,34±0,02	1,91±0,03	2,1±0,05	1,81±0,04	1,59±0,04	1,14±0,03	0,89±0,03	0,49±0,03

Таблица 2.

Среднемесячный удой чистопородных, местных и помесных коз за 3-й лактационный период (л)

Породы и помеси (4-летние)	МЕСЯЦЫ								
	Март	Апрель	Май	Июнь	Июль	Август	Сентябрь	Октябрь	За лактацию
Альпийские	92,4	90,6	85,8	76,2	59,7	56,4	46,8	40,8	548,7
Зааненские	99,9	92,4	102,3	80,7	81,3	59,1	51,0	43,2	609,9
Тоггенбургские	58,8	63,0	57,0	57,6	45,0	39,9	36,0	33,0	390,3
Местные	33,3	31,5	36,6	30,3	27,0	21,6	16,8	9,6	206,7
Помеси F ₁	39,0	59,4	59,1	41,4	34,8	26,1	20,4	10,8	291,0
Помеси F ₂	39,9	49,5	60,3	52,5	36,9	27,9	21,3	11,1	299,1
Помеси F ₃	40,2	57,3	63,0	54,3	47,7	34,2	26,7	14,7	338,1

Приведенные данные еще раз свидетельствуют о том, что одним из эффективных приемов повышения молочной продуктивности местных коз является скрещивание.

Анализ результатов месячных удоев коз показывает, что наиболее высокие показатели отмечаются в первые три месяца лактации, вместе с тем у альпийских, зааненских и местных коз во втором месяце лактации констатируется незначительный спад молочности с последующим повышением уже в третьем месяце, что превосходит удоюм первого месяца лактации. Что же касается помесей, то у всех трех поколений с первого по третий месяц лактации наблюдается последовательное повышение удою. Пик молочной продуктивности у всех пород и породных групп приходится на 3-й месяц лактации, однако и в этот период местные козы по молоч-

ности достоверно уступают как завезенным породам, так и помесям всех трех поколений (соответственно с альпийскими – $P < 0,001$; с зааненскими – $P < 0,001$; с тоггенбургскими – $P < 0,02$; с помесями: $F_1 - P < 0,05$; $F_2 - P < 0,01$ и $F_3 - P < 0,01$). Начиная с четвертого месяца до конца лактации их продуктивность закономерно падает (табл. 3). Следует отметить, что начиная с мая месяца коз переводят на летние субальпийские пастбища с. Гнишик, что и оказывает положительное влияние на молочную продуктивность за этот период.

Примечателен и тот факт, что вариабельность месячных удоев за лактацию у местных и помесных коз более высокая, чем у чистопородных козематов. Помимо этого, их молочная продуктивность за последний месяц лактации почти в два раза уступает чистопородным, что, по всей видимости,

Таблица 3.

**Изменчивость молочности коз разных генераций в течении лактации
(удой за всю лактацию принят за 100 %)**

Породы и помеси	Молочность за всю лактацию, л	В % от общей молочности							
		Март	Апрель	Май	Июнь	Июль	Август	Сентябрь	Октябрь
Альпийская	548,7	16,8	16,5	15,6	13,9	10,9	10,3	8,5	7,4
Зааненская	609,9	16,4	15,2	16,8	13,2	13,3	9,7	8,3	7,1
Тоггенбургская	390,3	15,1	16,1	14,6	14,8	11,5	10,2	9,2	8,5
Местная	206,7	16,1	15,2	17,7	14,7	13,1	10,4	8,1	4,6
Помеси F ₁	291,0	13,4	20,4	20,3	14,2	12,0	9,0	7,0	3,7
Помеси F ₂	299,1	13,3	16,5	20,2	17,6	12,3	9,3	7,1	3,7
Помеси F ₃	338,1	11,9	16,9	18,6	16,1	14,1	10,1	7,9	4,3

Таблица 4.

Биохимические тесты молока чистопородных, местных и помесных коз за 3-ю лактацию

Породы породные группы (4-летние)	Лизоцимная активность, %	Fe в лактоферине, мг/мл	Ксантиноксидаза, ед./мл	Казеин, г/л	Лактальбумины, г/л	Лактглобулины, г/л
Альпийская	30,1±1,15	0,55±0,12	0,06±0,01	1,6±0,1	0,17±0,012	0,23±0,02
Зааненская	34,7±3,5	0,75±0,13	0,06±0,004	2,02±0,1	0,2±0,01	0,32±0,01
Тоггенбургская	34,7±0,7	0,51±0,07	0,09±0,008	2,06±0,04	0,23±0,03	0,37±0,05
Местная	47,4±7,6	0,66±0,18	0,08±0,006	2,07±0,2	0,22±0,008	0,39±0,004
Помеси F ₁	38,3±3,7	0,60±0,17	0,075±0,01	2,5±0,2	0,25±0,02	0,4±0,03
Помеси F ₂	41,5±11,4	0,44±0,09	0,07±0,014	2,2±0,2	0,20±0,01	0,49±0,01
Помеси F ₃	41,1±5,9	0,76±0,09	0,085±0,008	3,0±0,3	0,29±0,03	0,47±0,05

связано с их генетическими особенностями, метаболическими процессами, интенсивностью обмена веществ и другими паратипическими факторами.

Представленные в таблице 4 результаты определения ряда важных функциональных показателей молока (лизоцимная активность, содержание казеина, лактальбуминов, лактглобулинов и железа лактоферина) выявляют либо отсутствие достоверных различий в этих показателях, либо относительно более высокое количество в молоке местных и помесных коз. Так, в молоке местных коз лизоцимная активность на 57,5 % и 36,6 % превышает таковую молока завезенных и статистически значимо не отличается от помесных коз. Характерны также несколько более высокие концентрации казеина, альбу-

минов и глобулинов молока помесных коз в сравнении с высокопродуктивными завезенными. В ксантиноксидазной активности и содержании железа лактоферина молока достоверных различий не отмечается.

Заключение

Скрещивание высокопродуктивных завезенных молочных коз с местными приводит к существенному повышению молочной продуктивности F₁, F₂ и особенно F₃ помесей. Местные и, в особенности, помесные козы по содержанию казеина, сывороточных белков (лактальбумины, лактглобулины) и активности ксантиноксидазы существенно не отличаются от завезенных. Вместе с тем лизоцимная активность молока у них превышает таковую завезенных.

Список литературы

1. Мармарян, Г. Ю. Сезонная активность ферментов крови коз разводимых в Армении / Г. Ю. Мармарян // Овцы, козы, шерстяное дело. – 2006. – № 4. – С. 86–89.
2. Мармарян, Г. Ю. Особенности белкового метаболизма чистопородных и помесных коз разного поколения в предгорных условиях Армении / Г. Ю. Мармарян, Н. Х. Бабаян, Г. А. Арутюнян, Р. Г. Камалян // Овцы, козы, шерстяное дело. – 2010. – № 4. – С. 72–75.
3. Graph Pad. Instat version 3,0 for Windows. The Instat guide to choosing and interpreting statistical tests / Intuitive Software for Science, San Diego, USA. 1998–1999.
4. Deshmukh, A.R. Cellulose acetate and polyacrylamide gel electrophoresis for quantification of milk protein fractions / A. R. Deshmukh, J. D. Donker, P. B. Addis, R. Jenness // J. Dairy Sci. – 1989. – P. 72:12–17.
5. Newsholme, P. Why is l-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, surgery or infection / P. Newsholme // J. Nutrition. – 2001. – V. 131 (9). – P. 2515S–2522S.
6. Newsholme, P. Glutamine and glutamate as vital metabolites / P. Newsholme, M. M. R. Lima, J. Procopio, T. C. Pithon-Curi, S. Q. Dois, R. B. Bazotte, R. Curi // J. Med. Biol. Braz. – 2003. – V. 36 (2). – P. 153–163.
7. Scarlata, R. W. A micromethod for determination of serum iron and serum iron binding capacity / R. W. Scarlata // J. Clin. Chem. – 1962. – V. 8. – № 4. – P. 360–369.
8. Selested, M. E. A simple and ultrasensitive enzymatic assay for the quantitative determination of lysozyme in the pictogram range / M. E. Selested, R. J. Martinez // J. Anal. Biochem. – 1980. – P. 109:67–70.
9. Waud, W. R. Xanthine oxidase assay / W. R. Waud, K. V. Rajagopalan // J. Arch. Biochem. Biophys. – 1976. – P. 172, 365–379.

АРТРОГЛИКАН (ARTROGLYCAN)

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

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

Фармакологическое действие

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

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

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

Артроглицан восполняет дефицит витамина Е, кальция и селена.

Показания

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

Заказ Артроглицана

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

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

в Москве: ООО «АС-Маркет», т. (498) 696-00-10; ООО «ЗооВетКом», т. +7 926 369-70-55;

ЗАО «ВетИмпэкс», т. (495) 786-97-81, 786-97-82; ООО «BETMARKET», т. (495) 777-60-81,

777-61-06; ООО «Торговый Дом «Гама-Маркет», т. (499) 190-72-41;

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

e-mail: investbio@mail.ru



УДК 612.118.221.3:546.492

Ключевые слова: эритроциты млекопитающих, хлорид ртути, гипотонический гемолиз

Key words: mammalian erythrocytes, mercury chloride, hypotonic hemolysis

Шпакова Н. М., Нипот Е. Е., Орлова Н. В.

ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА РТУТИ НА РАЗВИТИЕ ГИПОТОНИЧЕСКОГО ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

EFFECT OF MERCURY CHLORIDE ON DEVELOPMENT OF HYPOTONIC HEMOLYSIS OF MAMMALIAN ERYTHROCYTES

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Адрес: 61015, Украина, г. Харьков, ул. Переяславская, 23. Тел. +038 (057) 373-41-43

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine

Address: 610015, Ukraine, Kharkov, Pereyaslavskaya street, 23. Tel. +038 (057) 373-41-43

Шпакова Наталия Михайловна, к. б. н., ст. научн. сотрудник

Shpakova Nataliya M., Ph.D., Senior Research Scientist

Нипот Елена Евгеньевна, к. б. н., ст. научн. сотрудник

Nipot Elena Ye., Ph.D., Senior Research Scientist

Орлова Наталья Викторовна, к. б. н., ст. научн. сотрудник

Orlova Nataliya V., Senior Research Scientist

Аннотация. В работе представлены результаты о взаимодействии хлорида ртути с эритроцитами человека, быка и кролика, находящимися в гипотонических растворах NaCl. Используя кривые изменения оптической плотности эритроцитов разных видов млекопитающих, оценивали скорость гемолиза и конечный уровень повреждения клеток. Наиболее подверженными повреждающему действию ионов ртути оказались эритроциты быка, наименее – клетки кролика. Полученные в работе результаты свидетельствуют в пользу того, что ионы ртути в первую очередь взаимодействуют с липидной компонентой эритроцитарной мембраны.

Summary. In the work the results on the interaction of mercury chloride with human, bovine and rabbit erythrocytes being in NaCl hypotonic solutions are presented. Using the curves of the changes in optical density of erythrocytes of various mammals there were assessed hemolysis rate and final rate of cell damage. Bovine erythrocytes were the most confirmed to damaging effect of mercury ions and rabbit erythrocytes were the least confirmed. The findings testify to the favor of the fact that mercury ions primarily interact with lipid component of erythrocyte membrane.

Введение

Изучение влияния на биологические объекты неблагоприятных факторов окружающей среды, в частности тяжелых металлов, соли которых высокотоксичны для живых организмов, является важной задачей современной науки. Их токсическое действие в значительной степени связано со структурными и, как следствие, функциональными изменениями в клеточной мембране, которая является местом связывания ионов тяжелых металлов. Существует большое количество работ, описывающих влияние ионов ртути на эритроциты человека [3, 4, 6]. Эритроциты животных менее изучены в этом отношении. В связи с этим представляло интерес изучить эффекты солей ртути на эритроциты разных видов млекопитающих, клетки которых характеризуются особенностями липидного и белкового состава их

мембран, функционирования транспортных систем.

В данной работе представлены результаты о взаимодействии неорганической ртути с эритроцитами человека, быка и кролика в условиях помещения их в растворы NaCl пониженной тоничности, где наблюдается увеличение объема и частичное разрушение эритроцитов. Исследование влияния ионов ртути на эритроциты разных видов млекопитающих позволит получить дополнительные данные о взаимодействии металла с клеткой и выявить межвидовые особенности реакции эритроцитов человека, быка и кролика на действие ионов ртути.

Материалы и методы

Для исследования использовали эритроциты, полученные из крови человека (*Homo sapiens*), быка (*Bos taurus*) и кролика

ка (*Oryctolagus cuniculus*), заготовленной на консерванте «Глюгидир». После удаления плазмы эритромассу дважды отмывали в 10-кратном объеме физиологического раствора (0,15 М NaCl, 0,01 М фосфатный буфер, pH 7,4) путем центрифугирования при 1500 g в течение 3 мин. и хранили в виде плотного осадка не более двух часов при температуре 0 °С. Все используемые в работе среды готовили на 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,4.

Концентрацию растворов контролировали измерением осмоляльности на осмометре ОМКА 1Ц-01 (Украина).

Регистрацию динамики гипотонического гемолиза эритроцитов проводили на установке для измерения светорассеяния клеточных суспензий. Уровень гемолиза рассчитывали по формуле: Гемолиз = $(1 - A/A_0) \cdot 100 \%$, где A – оптическая плотность исследуемого образца после завершения гемолиза, A_0 – оптическая плотность контрольного образца, соответствующая 0 % уровню гемолиза. Скорость гемолиза рассчитывали как изменение оптической плотности за единицу времени. Использовали максимальное значение скорости для каждого образца.

Хлорид ртути в различных концентрациях вносили в кювету перед добавлением эритроцитов.

Статистически результаты были обработаны с помощью критерия Манна – Уитни.

Результаты и их обсуждение

Гипотонический гемолиз эритроцитов часто используется как тест для определения изменений в их плазматической мембране. Степень повреждения клетки в гипотонической среде определяется способностью мембраны к растяжению и репарации возникших в ней повреждений. Поскольку эритроциты млекопитающих обладают различной чувствительностью к снижению тоничности окружающей среды [2], то в работе были выбраны различные гипотонические среды, в которых уровень гемолиза эритроцитов составляет примерно 60 %. Концентрация NaCl в этих средах была 75, 80 и 85 мМ для эритроцитов человека, кролика и быка соответственно. Исходя из приведенных значений, наиболее чувствительными к гипотоническому гемо-

лизу являются эритроциты быка, наименее – клетки человека. Возможно, отмеченная разница в гипотонической чувствительности эритроцитов млекопитающих обусловлена качественно-количественными особенностями липидного состава их мембран. Поскольку холинсодержащие фосфолипиды в эритроцитах быка представлены исключительно сфингомиелином (при фактически полном отсутствии фосфатидилхолина), их мембрана является более жесткой по сравнению с мембраной эритроцитов человека, в которой представлены оба фосфолипиды [10]. Очевидно, что более жесткая мембрана эритроцитов быка обладает меньшей способностью к растяжению, что и проявляется в большей чувствительности этих клеток к действию гипотонических сред. Степень повреждения в гипотонической среде может также определяться значениями поверхностно-объемного отношения клеток. Известно [1], что для эритроцитов быка, кролика и человека величины отношения площади поверхности к объему составляют 2,22; 2,11; 1,99 соответственно. Таким образом, клетки, характеризующиеся большим значением поверхностно-объемного отношения, легче повреждаются в гипотонических средах.

На рис. 1 представлены типичные кривые гипотонического гемолиза эритроцитов млекопитающих на примере клеток человека в средах, содержащих различные концентрации $HgCl_2$. Динамика изменения оптической плотности эритроцитов в присутствии хлорида ртути характеризуется определенными особенностями. Для небольших концентраций ртути (рис. 1б) наблюдается рост как уровня, так и скорости повреждения эритро-

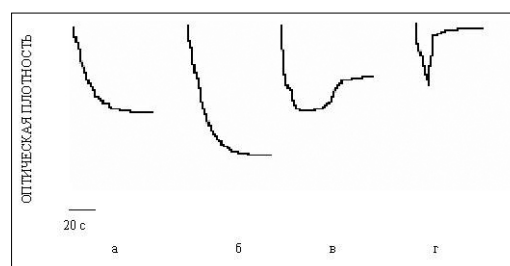


Рис. 1. Типичные кривые гипотонического гемолиза эритроцитов человека в средах с различными концентрациями $HgCl_2$; а – контроль, б – 25 мкМ, в – 100 мкМ, г – 500 мкМ.

цитов по сравнению с контрольным образцом (рис. 1а), в то время как при более высоких значениях (рис. 1в, 1г) – на фоне дальнейшего роста скорости гемолиза отмечается снижение конечного уровня повреждения клеток. Используя кривые изменения оптической плотности эритроцитов разных видов млекопитающих, мы оценивали скорость гемолиза и конечный уровень повреждения клеток. Полученные данные для эритроцитов человека представлены на рисунке 2.

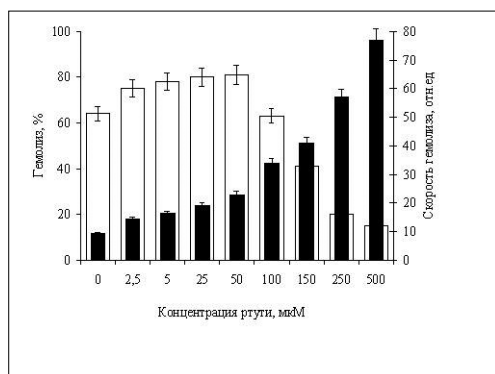


Рис. 2. Зависимость уровня (□) и скорости (■) гемолиза эритроцитов человека от концентрации HgCl_2 в среде инкубации (75 мМ NaCl, 5 мМ фосфатный буфер, pH 7,4).

Видно, что с увеличением концентрации HgCl_2 до определенного значения уровень гемолиза эритроцитов несколько возрастает, после чего наблюдается выраженное снижение повреждения (более чем в 3 раза по сравнению с контролем). В то же время следует отметить, что скорость гемолиза нарастает во всем диапазоне исследуемых концентраций HgCl_2 .

Аналогичные данные были получены для эритроцитов кролика (рис. 3) и быка (рис. 4). Обращает на себя внимание тот факт, что концентрационные зависимости уровня и скорости гипотонического гемолиза эритроцитов человека, кролика и быка имеют схожий характер.

Из результатов, представленных на рисунках 2–4, видно, что существует критическая концентрация хлорида ртути, при превышении которой наблюдается снижение конечного уровня повреждения. Если для эритроцитов быка и человека эта критическая концентрация – 50 мкМ HgCl_2 , то для клеток кролика она ниже и составляет 25 мкМ.

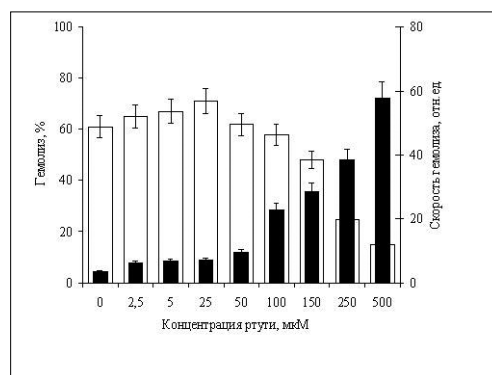


Рис. 3. Зависимость уровня (□) и скорости (■) гемолиза эритроцитов кролика от концентрации HgCl_2 в среде инкубации (80 мМ NaCl, 5 мМ фосфатный буфер, pH 7,4).

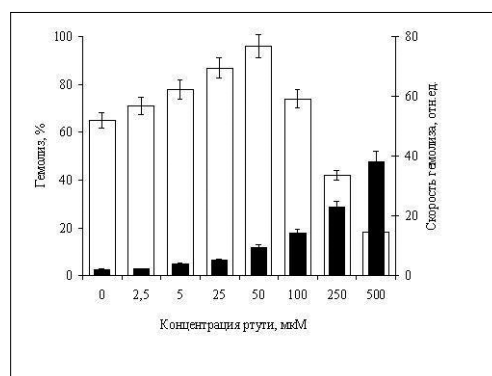


Рис. 4. Зависимость уровня (□) и скорости (■) гемолиза эритроцитов быка от концентрации HgCl_2 в среде инкубации (85 мМ NaCl, 5 мМ фосфатный буфер, pH 7,4).

Следует отметить, что при одном и том же уровне гемолиза (~ 60 %) контрольных клеток значения скорости гипотонического повреждения эритроцитов разных видов млекопитающих различны, причем эта величина максимальна для эритроцитов человека и минимальна для эритроцитов быка (рис. 2–4). Согласно работам [5, 8], различия в скорости гипотонического гемолиза эритроцитов млекопитающих могут быть обусловлены текучестью их мембран. Авторы этих работ полагают, что в эритроцитах, обладающих более жесткой мембраной, затруднено формирование гемолитических пор, что и обуславливает меньшую скорость гипотонического гемолиза этих клеток при одинаковом уровне повреждения (рис. 2–4).

При помещении эритроцитов в гипотоническую среду, содержащую HgCl_2 , происходит взаимодействие ионов ртути с поверхностью клеточной мембраны. Связывание ионов ртути происходит как с липидами, так и с бел-

ками эритроцитарной мембраны. В работе [3] показано, что преимущественным местом связывания являются аминокислоты полярных головок фосфолипидов, в частности фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина, что приводит к значительному увеличению жесткости мембраны. Это, в свою очередь, обуславливает снижение способности клеточной мембраны к растяжению в гипотонической среде и, как следствие, увеличению уровня гемолиза. Известно [10], что эритроциты всех исследуемых видов млекопитающих незначительно отличаются по содержанию фосфатидилэтаноламина. В то же время содержание фосфатидилсерина в эритроцитах быка примерно в 1,5 раза выше, чем в эритроцитах человека и кролика. Следовательно, увеличение жесткости мембраны в результате модификации фосфатидилсерина ионами ртути может лежать в основе более значительного роста повреждения клеток быка при небольших концентрациях HgCl_2 (рис. 4) по сравнению с клетками кролика и человека (рис. 2, 3). К уменьшению текучести мембран может привести и взаимодействие HgCl_2 с белками мембран, поскольку возможно как прямое взаимодействие ионов ртути с белками, так и опосредованное влияние через фосфатидилсерин, участвующий в прикреплении цитоскелета к эритроцитарной мембране [9].

Известно, что взаимодействие ионов ртути с эритроцитами ведет к потере клетками ионов калия [4]. Это может приводить к уменьшению объема набухшей клетки, росту оптической плотности и, соответственно, снижению уровня конечного повреждения. Для эритроцитов кролика снижение конечного уровня повреждения происходит при меньших значениях концентрации хлорида ртути (рис. 3), чем для эритроцитов быка и человека. Это можно объяснить более высоким содержанием аквапоринов в эритроцитах кролика. Ртутьсодержащие вещества, в том числе и HgCl_2 , взаимодействуют с аквапоринами, что проявляется в блокировании водного транспорта [6]. В условиях гипотонии это приведет к замедлению набухания клетки и в сочетании с выходом ионов калия является дополнительным фактором, обуславливающим снижение уровня конечного повреждения.

Однако следует отметить, что эритроциты быка являются низкокалийными клетками [1] и рост оптической плотности в этом случае нельзя объяснить уменьшением объема клеток из-за выхода ионов калия. Возможно, при увеличении концентрации HgCl_2 часть ионов ртути проникает внутрь клетки через повреждения мембраны и связывается с гемоглобином и цитоплазматическими белками, формируя комплексы, которые не могут покинуть клетку. Проведенные нами микроскопические исследования эритроцитов человека в гипотонических растворах в присутствии HgCl_2 выявили формирование крупных образований на поверхности эритроцита, предположительно в районе формирования гемолитической поры (данные не приведены). Вследствие этого может повышаться плотность самой клетки и, как следствие, оптическая плотность суспензии [7]. Также нельзя исключить возможность микровезикуляции, которая будет вносить вклад в рост оптической плотности в результате увеличения числа рассеивающих центров [4].

Заключение

Таким образом, наиболее подверженными повреждающему действию ионов ртути оказались эритроциты быка, так как для них наблюдалась наиболее выраженная активация гипотонического гемолиза. Для эритроцитов кролика характерен наименьший рост уровня гемолиза, однако снижение повреждения наблюдалось при более низкой концентрации HgCl_2 , чем для эритроцитов других видов млекопитающих. Это может свидетельствовать о том, что нарушение водного транспорта в эритроцитах кролика наступает при более низких значениях концентрации HgCl_2 . Тот факт, что вначале происходит активация гемолиза эритроцитов, связанная с увеличением жесткости мембраны, свидетельствует о том, что в первую очередь происходит взаимодействие ионов ртути с липидной компонентой мембраны. Взаимодействие ионов ртути с белками либо запаздывает, либо процесс взаимодействия занимает больше времени, и, как следствие, видимые результаты взаимодействия проявляются позже.

Список литературы

1. Комарова, Н. К. Физико-химические свойства эритроцитов крови человека и животных в норме и при некоторых эндогенных и экзогенных воздействиях на организм. Учебно-методическое пособие / Н. К. Комарова с соавт. – Оренбург : ОГАУ, 2003. – 20 с.
2. Шпакова, Н. М. Осмотичний і температурний стресс еритроцитів різних видів ссавців / Н. М. Шпакова // Біологія тварин. – 2011. – Т. 12. – № 1. – С. 382–391.
3. Delnomdedieu, M. Interaction of inorganic mercury salts with model and red cell membranes: importance of lipid binding sites / M. Delnomdedieu, J. W. Allis // Chem Biol Interact. – 1993 – Vol. 88. – № 1. – P. 71–87.
4. Kyung-Min, Lim. Low-level mercury can enhance procoagulant activity of erythrocytes: a new contributing factor for mercury-related thrombotic disease / Lim Kyung-Min et. al // Environ Health Perspect. – 2010. – Vol. 118. – № 7. – P. 928–935.
5. Minetti, M. Role of membrane thermotropic properties on hypotonic hemolysis and hypertonic cryohemolysis of human red blood cells / M. Minetti, M. Ceccarini, A. M. Di Stasi // J Cell Biochem. – 1984. – Vol. 25. – № 2. – P. 61–72.
6. Pribush, A. Kinetics of erythrocyte swelling and membrane hole formation in hypotonic media / A. Pribush, D. Meyerstein, N. Meyerstein // Biochim Biophys Acta. – 2002. – Vol. 1558. – № 2. – P. 119–132.
7. Salhany, J. M. Light-scattering measurements of hemoglobin binding to the erythrocyte membrane. Evidence for transmembrane effects related to a disulfonic stilbene binding to band 3 / J. M. Salhany, K. A. Cordes, E. D. Gaines // Biochemistry. – 1980. – Vol. 19. – № 7. – P. 1447–1454.
8. Sato, Y. Mechanism of hypotonic hemolysis of human erythrocytes. / Y. Sato, H. Yamakose // Biol Pharm Bull. – 1993. – Vol. 16. – № 5. – P. 506–12.
9. Yawata, Y. Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model / Y. Yawata. – Weinheim : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003. – 448 p.
10. Wessels, J. M. C. Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes III. Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species / J. M. C. Wessels, J. H. Veerkamp // Biochim. Biophys. Acta. – 1973. – Vol. 291. – № 1. – P. 190–196.

JSAP
JOURNAL OF SMALL ANIMAL PRACTICE

РОССИЙСКОЕ ИЗДАНИЕ

Издательский дом «Логос Пресс» представляет вашему вниманию первое переводное оригинальное научно-практическое издание для ветеринарных врачей, освещающее проблемы лечения и профилактики заболеваний мелких домашних животных – журнал «JSAP /Российское издание».

Данный проект – Российская версия журнала «Journal of Small Animal Practice» – официального печатного органа Британской ассоциации ветеринарии мелких домашних животных (BSAVA), осуществляющей свою деятельность с 1957 года.

На страницах издания публикуются обзорные статьи, результаты исследований и описания клинических случаев, авторами которых являются специалисты ведущих мировых центров ветеринарной науки и практики. В рубрике «Российская ветеринарная практика» представлены материалы о новых лекарственных средствах и принципах фармакотерапии мелких домашних животных.

Журнал представляет теоретическую и практическую ценность для ветеринарных врачей различных специальностей, студентов и преподавателей профильных ВУЗов.

Номера журнала представлены в Российской книжной палате, центральных библиотеках РФ, научной электронной библиотеке (НЭБ) и на сайте издательства www.jsap.ru.

Наши координаты:

E-mail: info@logospress.ru, тел.: + 7 (495) 220-48-16, факс: + 7 (499) 978-57-43

УДК 630:576.8:632

Ключевые слова: дельта-эндотоксин *Bacillus thuringiensis*, микробиота кишечника, гемолитические *E. coli*, дисбактериоз

Key words: delta-endotoxin of Bacillus thuringiensis, intestinal microbiota, hemolytic E. coli, bacteria overgrowth

Климентова Е. Г.

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ESCHERICHIA COLI, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ТОЛСТОЙ КИШКИ МЫШЕЙ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ДИСБАКТЕРИОЗОМ, ОБУСЛОВЛЕННЫМ ДЕЙСТВИЕМ δ -ЭНДОТОКСИНОВ BACILLUS THURINGIENSIS *ANTAGONISTIC ACTIVITY OF HEMOLYTIC ESCHERICHIA COLI, ISOLATED FROM THE COLON OF MICE WITH EXPERIMENTAL DYSBIOSIS CAUSED BY THE ACTION OF δ -ENDOTOXINS OF BACILLUS THURINGIENSIS*

ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет». Адрес: 432000, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42
Ulyanovsk State University. Address: 432000, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy street, 42

Климентова Елена Георгиевна, к. б. н., доцент
Klimentova Elena G., Ph.D., Associate Professor

Аннотация. В статье приведены результаты изучения антагонистической активности гемолитических *Escherichia coli*, выделенных из толстой кишки мышей с экспериментальным дисбактериозом, обусловленным длительным применением высоких доз δ -эндотоксинов *Bacillus thuringiensis*, по отношению к ряду симбиотических бактерий и ее связь с наличием ферментативной активности, в частности со способностью ферментировать лактозу.

Summary. This article presents the results of the study on the antagonistic activity of hemolytic *Escherichia coli* against a number of symbiotic bacteria and its relation to the presence of enzymatic activity and in particular the ability to ferment lactose. Abovementioned *Escherichia coli* were isolated from the colon of mice with experimental dysbiosis caused by prolonged use of high doses of δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*.

Введение

В настоящее время известно о более чем 200 антибиотиках, бактерицинах, эндо- и экзотоксинах, образуемых энтомопатогенной спорообразующей бактерией *Bacillus thuringiensis*. Споро-кристаллический комплекс и отдельные параспоральные белки (Cry- и Cyt-белки, δ -эндотоксины) данной бактерии являются основой наиболее эффективных и широко применяемых биопестицидов для борьбы с вредными насекомыми; кроме того, cry-гены введены в целый ряд растений для их защиты от вредных насекомых (генно-модифицированные Vt-растения – растения со встроенным геном, кодирующим синтез токсинообразования). Показано, что Cry- и Cyt-белки параспоральных кристаллов обладают выраженной биологической активностью по отношению к прокариотам различных систематических групп [7, 8, 9].

Большие количества активных белков и их фрагментов, содержащихся в биопести-

цидах или в трансгенных Vt-растениях, попадая в организмы различных животных при питании, могут существенно повлиять на симбиотические биоценозы кишечника, изменяя биологические свойства отдельных представителей микробиоты, усиливая или, напротив, селективно подавляя их рост [6], способствуя образованию гетерогенности популяции по различным биологическим признакам.

Ранее было установлено, что высокие дозы δ -эндотоксинов *B. thuringiensis* (100 мг / кг веса и более), вводимых белым мышам перорально, приводят к микробиологическим нарушениям в кишечнике животных, приводящим к развитию дисбактериоза. Образующиеся популяции бактерий содержали штаммы с измененными биологическими свойствами (гемолитические), способные к продуцированию дополнительных факторов патогенности [4].

В соответствии с рассмотренными выше обстоятельствами, актуальным является ис-

следование, позволяющее установить характер изменения межбактериальных взаимодействий в биотопе толстой кишки белых мышей с признаками дисбактериоза, обусловленного пероральным введением высоких доз δ -эндотоксинов *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, на основе изучения антагонистической активности гемолитических штаммов *E. coli* в отношении других симбионтов микробиоценоза.

Объекты и методы исследований

В работе использовали 39 штаммов гемолитических *E. coli*, выделенных из биотопа толстого кишечника белых мышей на 14 и 28 сутки после начала перорального введения раствора δ -эндотоксинов *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* в дозе 100 мг/кг веса.

Антагонистическую активность *E. coli* Hly+ определяли методом отсроченного антагонизма [3]. Для контроля вместо индикаторного штамма высевалась изучаемая культура *E. coli* Hly+. В качестве индикаторных штаммов использовались культуры лактобактерий (84 штамма), условно-патогенных энтеробактерий – *Klebsiella* spp. (17 штаммов), *Proteus* spp. (21 штамм), *Citrobacter* spp. (19 штаммов), типичные *E. coli* (57 штаммов), а также стафилококки: *St. aureus*., не обладающие гемолитической активностью (46 штаммов), и *St. epidermidis* (19 штаммов), выделенные от мышей с экспериментальным дисбактериозом. Титры штаммов *E. coli* Hly+ – продуцентов факторов ингибирования и культур индикаторных штаммов – 10⁶–7 клеток/мл. Через 24–48 часов культивирования при оптимальной для испытуемых культур температуре и условиях культивирования (микроаэрофильных для лактобактерий) учитывали расстояние зоны задержки роста индикаторных штаммов. Такие условия культивирования создавали отдельные оптимальные условия как для роста штамма – продуцента факторов антагонизма, так и для роста индикаторной культуры.

Микроорганизмы выделялись из содержимого толстой кишки животных с использованием классических бактериологических методик. Анализ выделенных микроорга-

низмов проводили согласно определителю Берджи [5] по морфологическим, биохимическим и культуральным признакам. Биохимическую идентификацию культур проводили с использованием тест-систем “Enterotest” и “Stafitest” фирмы “Lachema” (Чехия). Наличие *E. coli* Hly+ учитывали на кровяном агаре из разведения 10⁻⁵.

Все материалы были подвергнуты статистической обработке с использованием методов статистического и вариационного анализа. Различия между величинами считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследований

E. coli, выделенные от мышей с экспериментальным дисбактериозом, обусловленном длительным пероральным введением высоких доз δ -эндотоксинов *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, вырастали на поверхности МПА в течение суток в виде полупрозрачных колоний с гладкой поверхностью и ровными краями размером примерно 3–4 мм. На среде Эндо они давали рост в виде красновато-малиновых колоний с металлическим блеском, при этом лактозонегативные штаммы росли в виде бледно-матовых колоний. Биохимические свойства выделенных штаммов *E. coli* соответствовали следующим показателям: малонат и цитрат натрия – отрицательный; цитрат натрия с глюкозой – расщепление с образованием кислоты и газа; лизиндекарбоксилаза и орнитиндекарбоксилаза – положительный; аргининдегидролаза и фенилаланиндезаминаза – отрицательный; индол – положительный; ацетилметилкарбинол, уреаз, образование сероводорода – отрицательный; глюкозу, лактозу, β -галактозидазу, манит, сахарозу, инозит, сорбит, арабинозу, мальтозу расщепляли с образованием кислоты и газа. Из всех выделенных штаммов 7 не расщепляли лактозу (лактозонегативные штаммы, lac-) и 11 штаммов были со слабо выраженной ферментативной активностью.

Из данных, представленных в таблице 1, следует, что все исследованные индикаторные штаммы оказались в той или иной степени чувствительны к антагонистическому действию гемолитических эшерихий.

Таблица 1.

Чувствительность индикаторных штаммов бактерий к антагонистическому действию *E. coli* Hly+ с нормальной ферментативной активностью (21 штамм)

№ п/п	Индикаторные штаммы	Число штаммов микроорганизмов в опыте, ед.	Чувствительных штаммов		Чувствительность в мм подавления роста
			Ед.	%	
1	<i>Lactobacillus</i> spp.	84	53,3±4,1	63,5±4,9	19,1±1,8
2	<i>E. coli</i> тип.	57	23,2±1,3	40,7±2,2	10,2±0,9
3	<i>Proteus</i> spp.	21	11,0±0,9	52,3±4,5	6,2±1,9
4	<i>Citrobacter</i> spp.	19	11,1±0,5	58,8±2,7	5,3±1,5
5	<i>Klebsiella</i> spp.	17	9,3±0,9	54,7±5,1	7,1±0,8
6	<i>St. aureus</i>	46	28,0±4,3	61,2±3,4	4,8±1,2
7	<i>St. epidermidis</i>	19	12,0±1,4	67,2±5,2	7,9±1,1

Примечание. Степень чувствительности индикаторных штаммов: до 2 мм – очень низкая; от 2 до 5 мм – низкая; 5–10 мм – средняя; более 10 мм – высокая.

Высокую чувствительность к антагонистическому действию к гемолитическим эшерихиям проявили 40,7±2,2 % штаммов типичных *E. coli*, величина подавления роста культуры составила 10,2±0,9 мм, и 63,5±4,9 % штаммов *Lactobacillus* spp., зона ингибирования их роста оказалась наибольшей и составила в среднем 19,1±1,8 мм. Из исследованных 19 штаммов *St. epidermidis* 12,0±1,4, или 67,2±5,2 %, проявили среднюю чувствительность к *E. coli* Hly+, величина подавления роста составила в среднем 7,9±1,1 мм. Такая же степень чувствительности оказалась у 52,3±4,5 % исследованных штаммов *Proteus* spp., 58,8±2,7 % штаммов *Citrobacter* spp. и у 54,7±5,1 % штаммов *Klebsiella* spp. Размер зон подавления роста варьировал от 5,3±1,5 до 7,1±0,8 мм. Наименее чувствительными к ингибирующему действию *E. coli* Hly+ оказались 61,2±3,4 % штаммов золотистого стафилококка с зоной подавления роста в среднем 4,8±1,2 мм.

Среди представителей кишечной нормофлоры *Lactobacillus* spp. оказались наиболее чувствительными к действию гемолитических эшерихий по зоне подавления роста (19,1±1,8 мм). Размер зон лизиса в среднем почти в 2 раза превышал таковую у нормальных *E. coli* (10,2±0,9 мм) и почти в 4 раза у *St. aureus* (4,8±1,2 мм). Чувствительность в мм подавления роста условно-патогенных энтеробактерий (*Proteus* spp., *Citrobacter* spp. и *Klebsiella* spp.) была примерно на одном уровне – от 5,3±1,5 до 7,1±0,8 мм.

Изучение влияния лактозного признака на антагонистическую активность штамма – продуцента факторов патогенности показало (табл. 2), что по отношению к культуре *Klebsiella* spp. проявилась наибольшая активность, рост клебсиэлл подавляли 100 % штаммов *E. coli* с пониженной ферментативной активностью и 72,5±8,7 % лактозонегативных штаммов. Немного менее активны были эшерихии с измененными биологическими свойствами по отношению к лактобациллам, рост этой культуры подавляли 66,8±4,8 % штаммов *E. coli* с пониженной ферментативной активностью и 72,5±8,7 % лактозонегативных штаммов. Стафилококковая микробиота – культуры *St. epidermidis* и *St. aureus* были чувствительны к антагонистическому действию примерно 62,5–67,0 % штаммов *E. coli* Hly+ с пониженной ферментативной активностью и 40,6–49,0 % лактозонегативных штаммов. Рост условно-патогенных энтеробактерий *Citrobacter* spp. подавлялся 59,2±6,0 % штаммов с пониженной ферментативной активностью и 33,8±2,9 % лактозонегативных штаммов. Самая низкая чувствительность к факторам антагонизма гемолитических эшерихий отмечалась у *Proteus* spp., лас-штаммы оказались активны только в 7,7±2,6 % случаев, штаммы с пониженной ферментативной активностью – только в 18,2±3,6 %. Рост клеток *E. coli* тип. подавлялся 51,2±3,6 % штаммов гемолитических эшерихий с пониженной

Таблица 2.

**Чувствительность индикаторных штаммов бактерий к *E. coli* Hly+,
различных по способности ферментировать лактозу**

№ п/п	Индикаторные штаммы	Чувствительные штаммы <i>E. coli</i> Hly+					
		1-я группа с пониженной ферментативной активностью (11 штаммов)		Чувстви- тельность в мм подавле- ния роста	2-я группа lac- (7 штаммов)		Чувстви- тельность в мм подавле- ния роста
		Кол-во (n)	в %		Кол-во (n)	в %	
1	<i>Lactobacillus</i> spp.	7,3±0,5	66,8±4,8	17,1±2,0	5,9±0,5	85,0±7,9	16,4±2,1
2	<i>E. coli</i> тип.	5,6±0,4	51,2±3,6	12,8±1,7	1,6±0,4	23,4±5,4	14,2±1,9
3	<i>Proteus</i> spp.	2,2±0,4	18,2±3,6	6,0±1,4	0,5±0,2	7,7±2,6	6,4±1,5
4	<i>Citrobacter</i> spp.	6,5±0,7	59,2±6,0	6,2±1,0	2,4±0,2	33,8±2,9	5,8±1,2
5	<i>Klebsiella</i> spp.	11, 0	100,0	7,5±0,6	5,1±0,6	72,5±8,7	7,8±0,5
6	<i>St. epidermidis</i>	6,9±0,5	62,5±4,3	7,0±1,2	2,9±0,3	40,6±4,3	7,1±1,0
7	<i>St. aureus</i>	7,4±0,6	67,0±5,5	5,2±1,4	3,4±0,2	49,0±3,2	5,0±1,1

ферментативной активностью и 23,4±5,4 % лактозонегативных штаммов.

По величине размеров зон подавления роста наиболее чувствительными оказались культуры *Lactobacillus* spp. и *E. coli* тип. (16,4–14,2 мм) и наименее – золотистый стафилококк (5,0 мм). Остальные индикаторные культуры микроорганизмов проявили среднюю устойчивость, размеры зон лизиса варьировали от 5,8 до 7,8 мм.

Обсуждение результатов

Совокупность всех микробиоценозов теплокровных животных и человека представляет собой единую экологическую систему, находящуюся в состоянии биологического равновесия. Вследствие изменения условий существования под действием, например, бактериальных токсинов, микроорганизмы могут переходить из разряда безвредных в агрессивную форму, при этом меняются и симбиотические отношения между микроорганизмами, входящими в один и тот же биотоп. Это характерно в основном для условно-патогенной микробиоты. При развитии дисбактериоза происходит снижение популяционного уровня форм *E. coli* с нормальной ферментативной активностью и создаются условия для избыточной колонизации кишечника лактозонегативными и обладающими гемолитической активностью штаммами, размножение которых в нормальных условиях подавлено конкуренцией со стороны активных симбионтов [1].

В данном исследовании было установлено, что гемолитические штаммы *E. coli* с нормальной ферментативной активностью обладали антагонистическим действием по отношению к бактериям – симбионтам микробиоценоза толстой кишки со способностью ингибировать рост лактобацилл, близкородственных энтеробактерий, в том числе типичную кишечную палочку, и неродственных патогенных и условно-патогенных микроорганизмов – стафилококков, протей и клебсиэлл.

По мере убывания чувствительности к ингибирующему действию *E. coli* Hly+ с нормальной ферментативной активностью по размеру зоны подавления роста культуры-симбионты микроценоза кишечника расположились следующим образом: *Lactobacillus* spp. > *E. coli* тип. > *St. epidermidis* > *Klebsiella* spp. > *Proteus* spp. > *Citrobacter* spp. > *St. aureus*.

Таким образом, гемолитические штаммы эшерихий с нормальной ферментативной активностью активнее всего подавляли рост представителей нормобиоты кишечника, а условно-патогенные и патогенные культуры оказались более устойчивы к подобному действию, и самым устойчивым микроорганизмом оказался золотистый стафилококк.

Известно, что популяция бактерий рода *E. coli* весьма гетерогенна и изменение биохимических свойств данного микроорганизма, в частности способности ферментировать

вать лактозу, как правило, влечет за собой и изменение способности к продуцированию факторов патогенности [2].

По степени чувствительности культур к ингибирующему действию гемолитических штаммов *E. coli* Hly+ с пониженной ферментативной активностью по размеру зоны подавления роста микроорганизмы расположились следующим образом: *Lactobacillus* spp. > *E. coli* тип. > *Klebsiella* spp. > *St. epidermidis* > *Citrobacter* spp. > *Proteus* spp. > *St. aureus*; а по степени чувствительности культур к ингибирующему действию гемолитических лактозонегативных штаммов *E. coli*: *Lactobacillus* spp. > *E. coli* тип. > *Klebsiella* spp. > *St. epidermidis* > *Proteus* spp. > *Citrobacter* spp. > *St. aureus*.

Заключение

Таким образом, гемолитические штаммы эшерихий с измененной ферментативной активностью также активнее всего подавляли рост представителей нормобиоты кишечника – неродственной культуры *Lactobacillus* spp. и близкородственных микроорганизмов – типичных *E. coli*. Среди представителей нормофлоры *Lactobacillus* spp. оказались наиболее чувствительными к действию лактозонегативных гемолитических эшерихий и по процентному содержанию (более 85 %), и по зоне подавления роста. Условно-патогенные и патогенные энтеробактерии оказались более устойчивы к подобному действию. Средняя бактерицидная активность обнаружена к микроорганизмам, которые не являются нормофлорой кишечника – клебсиеллам, эпидермальному стафилококку, протеем и цитробактериям. Самой устойчивой культурой по отношению к трем группам *E. coli* Hly+ оказался золотистый стафилококк. Следовательно, наблюдаются значительные различия в чувствительности разных систематических групп микроорганизмов к антагонистическому действию гемолитических штаммов эшерихий, и, как следствие, происходит формирование персистенции патогенной и условно-патогенной микрофлоры в толстом кишечнике за счет устойчивости к бактериоцинам и вытеснение из него представителей нормофлоры.

Следовательно, под действием высоких доз δ -эндотоксинов *B. thuringiensis* происходит формирование дисбиотических изменений в толстом кишечнике животных, изменение биохимических свойств *E. coli*, в частности способности ферментировать лактозу, что влечет за собой и изменение способности к продуцированию факторов патогенности данного микроорганизма.

Результаты, полученные в ходе данной работы, могут быть использованы при контроле регламента производства и оценке биологической активности промышленно выпускаемых биопестицидов, разработке норм и доз их безопасного применения, так как внедрение интенсивных технологий возделывания сельскохозяйственных культур неизбежно повлечет расширение применения микробиологических средств защиты растений, что приводит обычно к широкомасштабному загрязнению окружающей среды спорами, токсинами и другими биологически активными компонентами микроорганизмов. Кроме того, существуют риски возможного негативного влияния токсичных трансгенных белков Vt-растений, объемы выращивания которых во всем мире постоянно увеличиваются.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 12-04-97016-р_поволжье_a.

Список литературы

1. Барановский, А. Ю. Дисбактериоз и дисбиоз кишечника / А. Ю. Барановский, Э. А. Кондрашин. – СПб. : Питер, 2000. – 209 с.
2. Билалов, Ф. С. Некоторые факторы патогенности *E. coli*, выделенных от онкологических больных с инфекционными осложнениями / Ф. С. Билалов, З. Г. Габидуллин, М. М. Туйгунов, Ю. З. Габидуллин, Э. Ф. Мамбетова, А. А. Ахтариева, В. Г. Туйгунова // Известия Челябинского научного центра. – Вып. 2 (32), 2006. – С. 123–126.
3. Блинкова, Л. П. Бактериоцины: критерии, классификация, свойства, методы выявления / Л. П. Блинкова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2003. – № 3. – С. 109–113.
4. Климентова, Е. Г. Изменение микрофлоры толстого кишечника у мышей при длительном пероральном введении δ -эндотоксина *Bacillus thuringiensis* / Е. Г. Климентова, А. А. Купцова, Л. К. Каменек, В. В. Гулий // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – № 4. – С. 115–120.
5. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Пер. с англ. ; под ред. Хоулта Дж., Крига Н., Снита П., Стейли Дж., Уилльямса С. – Мир, 1997. – 800 с.

6. Парфенов, А. И. Антибиотико-ассоциированная диарея / А. И. Парфенов, И. Н. Ручкина, Г. А. Осипов // Экспер. и клин. гастроэнтерол. – 2002. – № 5. – С. 92–95.

7. Юдина, Т. Г. Антимикробная активность белковых включений различных бактерий / Т. Г. Юдина, Н. С. Егоров // Доклады РАН. – 1996. – Т. 349. – № 2. – С. 283–287.

8. Юдина, Т. Г. Действие эндотоксинов четырех подвидов *Bacillus thuringiensis* на различных проکاریот / Т. Г. Юдина, Л. И. Бурцева // Микробиология. – 1997. – Т. 66. – № 1. – С. 25–31.

9. Cahan, R. Antibacterial activity of Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* / R. Cahan, H. Friman, Y. Nitzan // Microbiology. – 2008. – 154. – P. 3529–3536.

В издательстве Института Ветеринарной Биологии вышла в свет книга проф. Кудряшова А.А.

«ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНЕЙ ЛОШАДЕЙ»

Данная книга является второй в серии «Ветеринарная патологическая анатомия», выпускаемой НОУ ДО «Институт Ветеринарной Биологии». Как и первая книга «Патологоанатомическая диагностика болезней собак и кошек» (www.invetbio.spb.ru/Kudryashov-2011.htm), настоящее издание является учебным пособием как для студентов ветеринарных факультетов, так и для врачей-иппологов.

В книге изложены порядок вскрытия лошадей, составления протоколов, правила отбора материала для дальнейших исследований, даны детальные описания 40 наиболее часто встречающихся заболеваний лошадей. Подробно освещены этиология, патогенез, клинические проявления и патологоанатомические изменения. Особое внимание уделено дифференциальной диагностике. Книга иллюстрирована большим количеством авторских фотографий, а также рисунками со схемами.

Тираж: 1000 экз. **Формат:** А5 (145 x 205 мм), мягкий переплет, 184 с. с илл.

Стоимость книги при заказе наложенным платежом составляет 1040 рублей.

По вопросу приобретения обращайтесь по тел. +7 921 095-89-27, e-mail: invetbio@yandex.ru

Форма on-line заказа: www.invetbio.spb.ru/form_kniga_Kudryashov-loshadi.htm

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ

ВСКРЫТИЕ ТРУПОВ ЛОШАДЕЙ

1. Место вскрытия и инструментарий
2. Техника безопасности
3. Некоторые анатомические особенности лошади
4. Определение возраста лошади
5. Масть лошади
6. Порядок вскрытия
7. Техника исследования отдельных органов
8. Протоколирование вскрытия (протокол вскрытия)
9. Отбор и сохранение патологического материала, предназначенного для лабораторных исследований

ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНЕЙ ЛОШАДЕЙ

ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

1. Сибирская язва
2. Злокачественный отек
3. Некробактериоз
4. Столбняк
5. Ботулизм
6. Сальмонеллез
7. Листерииоз
8. Лептоспироз
9. Моноцитарный эрлихиоз
10. Эпизоотический лимфангит
11. Язвенный лимфангит
12. Мыт
13. Кровапятнистая болезнь

14. Сап
15. Туберкулез
16. Бруцеллез
17. Инфекционная анемия
18. Герпесвирусные болезни
19. Грипп лошадей
20. Аденовирусная инфекция
21. Вирусные энцефалиты и энцефаломиелиты
22. Африканская чума однокопытных
23. Вирусный артериит
24. Бешенство
25. Болезнь Ауески
26. Оспа лошадей
27. Везикулярный стоматит
28. Коринебактериоз жеребят
29. Микотоксикозы
30. Идиопатический колит

ИНВАЗИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

1. Бабезиоз
2. Трипаномозы
3. Параскариоз
4. Деляфондиоз
5. Гастрофилез

НЕЗАРАЗНЫЕ БОЛЕЗНИ

1. Паралитическая миоглобинурия
2. Острое расширение желудка
3. Метеоризм кишечника
4. Перекручивание и заворот кишок
5. Амилоидоз печени

ИЛЛЮСТРАЦИИ

УДК 619:612.017.1:616-002.153:636.2-053.81

Ключевые слова: иммунный статус, экспрессия цитокинов, респираторные болезни

Key words: immune status, cytokine expression, respiratory diseases

Шахов А. Г., Федосов Д. В., Сашнина Л. Ю., Масьянов Ю. Н., Алехин Ю. Н.,
Сидельникова И. Р.

ВЛИЯНИЕ ИММУННОГО СТАТУСА НА ВОЗНИКНОВЕНИЕ И РАЗВИТИЕ РЕСПИРАТОРНЫХ БОЛЕЗНЕЙ У ТЕЛЯТ В УСЛОВИЯХ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ХОЗЯЙСТВ

*THE EFFECT OF IMMUNE STATUS ON THE ONSET AND DEVELOPMENT
OF A RESPIRATORY DISEASE IN CALVES AT SPECIALIZED FARMS*

Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии

Адрес: 394087, г. Воронеж, ул. Ломоносова, 114-б

All-Russian Veterinary Pathology, Pharmacology and Therapy Research Institute

Address: 394087, Russia, Voronezh, Lomonosov street, 114-b

Шахов Алексей Гаврилович, д. в. н., проф., член-корреспондент Россельхозакадемии,
зав. отделом микробиологии, вирусологии и иммунологии

*Shakhov Alexey G., Doctor of Veterinary Medicine, Professor, Corresponding Member of Russian Academy
of Agriculture Sciences, Head of the Dept. of Microbiology, Virology and Immunology*

Федосов Дмитрий Валериевич, научн. сотрудник отдела микробиологии, вирусологии и иммунологии
Fedosov Dmitri V., Research Scientist of the Dept. of Microbiology, Virology and Immunology

Сашнина Лариса Юрьевна, к. в. н., вед. научн. сотрудник отдела микробиологии, вирусологии и иммунологии
Sashnina Larisa Yu., Ph.D., Leading Research Scientist of the Dept. of Microbiology, Virology and Immunology

Масьянов Юрий Николаевич, д. в. н., ст. научн. сотрудник

Mas'yanov Yuri N., Doctor of Veterinary Medicine, Senior Research Scientist

Алехин Юрий Николаевич, к. в. н., зав. лабораторией клинико-функциональной диагностики
отдела патобиохимии и патофизиологии

*Alekhin Yuri N., Ph.D., Head of the Clinical-Functional Diagnostics Laboratory of the Pathobiochemistry
and Pathophysiology Dept.*

Сидельникова Ирина Романовна, аспирант отдела патобиохимии и патофизиологии

Sidelnikova Irina R., Postgraduate of the Pathobiochemistry and Pathophysiology Dept.

Аннотация. Установлено, что исходное состояние иммунного статуса влияет на выраженность ответной реакции организма при воздействии транспортного стресса, вакцинации, потенциальных возбудителей инфекций и имеет диагностическое и прогностическое значение у животных при возникновении и развитии респираторной патологии. У телят с более высокими показателями иммунного статуса болезни органов дыхания появлялись позже и протекали в относительно легкой форме.

Summary. It is established that initial state of the immune status influences the intensity of the organism response induced by transport stress, vaccination, potential pathogens, and has diagnostic and prognostic critical value for animals at onset and development of a respiratory disease. Respiratory diseases appeared later and developed comparatively easy in calves with higher rates of immune status.

Введение

Респираторные болезни молодняка крупного рогатого скота широко распространены, особенно на комплексах по доращиванию и откорму сборного поголовья, и наносят большой экономический ущерб [1, 2, 3].

Возникновение, тяжесть течения и исход заболеваний молодняка во многом определяется исходным морфо-функциональным состоянием организма, условиями содержания и кормления животных, санитарного состояния помещений, адаптацией животных

к стресс-воздействию разной этиологии, что отражается на состоянии иммунной системы, дисбаланс функционирования различных звеньев которой нарушает способность адекватного реагирования на экзогенные и эндогенные агенты [5, 6, 7, 9].

Цель исследования – изучить влияние иммунного статуса на сроки и характер течения респираторных болезней у телят, завезенных из хозяйств-поставщиков в спецхоз по доращиванию и откорму молодняка крупного рогатого скота.

Материалы и методы

Исследования проведены на телятах в возрасте 3–4 месяцев, завезенных из хозяйств-поставщиков Белгородской области на комплекс ОАО «Юбилейное» Хохольского района Воронежской области для доращивания и откорма.

Материалом для исследования служили цельная кровь, сыворотки крови и носовые смывы (выделения).

Бактериологические исследования носовых смывов (выделений) проводили общепринятыми методами, молекулярно-генетические – методом ПЦР с применением соответствующих утвержденных тест-систем. Амплификацию ДНК проводили в программируемом термостате «Терцик ТПЧ-ПЦР01». Для регистрации продуктов ПЦР использовали метод электрофоретического разделения продуктов амплификации в агарозном геле.

Уровень экспрессии генов цитокинов, участвующих в клеточном и гуморальном иммунитете (интерлейкин-1, интерлейкин-2, интерлейкин-4, интерлейкин-8, интерлейкин-12, фактор некроза опухоли α , γ -интерферон), определяли в цельной крови по модифицированной методике (Groot J. de с соавт., 2005) [8]. Из проб цельной крови животных выделяли общую РНК, которую подвергали обратной транскрипции. Образовавшуюся кДНК в концентрации 200 мкг/мл использовали в ПЦР с праймерами, специфичными для искомым генов [10]. После реакции ДНК образовавшегося продукта очищали при помощи набора для выделения ДНК («АмплиСенс») и измеряли ее концентрацию при 260 нм на спектрофотометре Shimadzu UV1700. Уровень экспрессии оценивали по наименьшему разведению кДНК, в котором получали положительный сигнал.

Показатели неспецифической резистентности – гемолитическую активность компонента (КАСК), бактерицидную (БАСК) и лизоцимную (ЛАСК) активность сыворотки крови, фагоцитарную активность лейкоцитов (ФАЛ), фагоцитарное число (ФЧ) и фагоцитарный индекс (ФИ), количество иммуноглобулинов М и G в сыворотке крови – опре-

деляли в соответствии с «Методическими рекомендациями по оценке и коррекции иммунного статуса животных» (2005) [4], лейкоциты, лейкоцитарную формулу – общепринятыми методами.

Результаты исследований и обсуждение

Подопытных клинически здоровых телят (n=100) разместили в освободившиеся станки волонки, в которой в течение месяца находились 550 телят 3–5 месячного возраста, заболеваемость последних респираторными болезнями составила 58,2 %. На следующий день подопытных животных иммунизировали против парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи вакциной «Тривак» двукратно.

В течение всего периода исследований респираторная патология была выявлена у 76 из 100. С учетом сроков появления первых признаков респираторных болезней животные были разделены на 3 группы, у 4 телят каждой из них был проведен анализ результатов клинических, иммунологических и молекулярно-генетических исследований на 2, 8, 15, 22 и 28 дни после транспортировки.

В первую группу вошли телята, у которых были выявлены симптомы субклинической стадии сухого макробронхита в конце первой недели пребывания на комплексе. В последующие 1–2 недели у них наблюдали манифестацию симптомов бронхита, сопровождавшегося появлением в покое сухого кашля, сухих хрипов в средней и нижней передней трети легочного поля, повышением частоты дыхания и температуры тела, а на 22–28 дни – симптомокомплекса бронхопневмонии с выраженными обструктивными явлениями.

Во вторую группу вошли телята, у которых в конце 2-й недели после завоза их на комплекс появились признаки сухого макробронхита, усилившегося в течение следующей недели, хотя выраженность лихорадки и нарушения внешнего дыхания снижались. У отдельных животных в течение двух недель, кроме того, регистрировали симптомы острого катарального трахеита, а в последнюю неделю исследований отмечали хрони-

ческое течение макробронхита и формирования синдрома обструкции бронхов.

В третью группу вошли животные, у которых клинические признаки болезней органов дыхания появились в конце 3-й недели после транспортировки. При этом у одних телят наблюдали слабовыраженные признаки макробронхита, у других – вначале симптомы катарального трахеита, а впоследствии признаки макробронхита. У больных животных отмечали лихорадку и увеличение минутного объема дыхания.

При фоновом молекулярно-генетическом и бактериологическом исследовании носовых смывов у телят были обнаружены геномы вируса ИРТ и микоплазм, выделены стрептококки групп Д и С, золотистый, сапрофитный и эпидермальный стафилококки.

При анализе показателей неспецифической резистентности установлено, что у животных третьей группы, заболевших в конце третьей недели после транспортировки, при фоновом взятии уровни гуморальных факторов были выше, чем у телят 1-й и 2-й групп, у которых клинические признаки появились раньше, соответственно в конце первой и второй недели: БАСК на 9,3 и 6,0 %, ЛАСК в 2,3 раза, а КАСК на 30,7 и 67,9 %. При этом показатели, характеризующие клеточное звено неспецифической защиты, существенно не отличались (табл. 1).

У всех подопытных животных было практически равным содержание IgM в сыворотке крови, но у телят 3-й группы была заметно выше, чем у животных первых двух групп, концентрация IgG – на 46,0 и 44,3 % соответственно.

Изучение экспрессии генов цитокинов показало, что у молодняка 1-й группы при фоновом взятии активность генов провоспалительного медиатора IL-1 и цитокинов первичного ответа TNF- α и INF γ в лейкоцитах носовых смывов значительно превышала таковую у телят 2-й и 3-й групп. Кроме того, в носовых смывах обнаружили мРНК интерлейкина-8 – активатора тканевых макрофагов, способствующего миграции нейтрофилов в очаг воспаления, что являлось сигналом, предшествующим возникновению воспалительного процесса у животных пер-

вой группы. На напряженность у телят 1-й группы иммунной системы указывало наличие сравнительно высокой экспрессии в лейкоцитах крови генов цитокинов, отвечающих за клеточный (IL-2) и гуморальный (IL-4) иммунный ответ (табл. 2).

При исследовании на 8-й день опыта у животных всех групп отмечали одинаковую тенденцию увеличения активности неспецифических гуморальных факторов, что могло быть следствием проведенной вакцинации. У телят 3-й группы уровни этих показателей были выше, чем у животных первых двух групп: БАСК – на 4,8 и 7,0 %, ЛАСК – на 33,3 и 23,1 %, а также поглотительная способность нейтрофилов (ФЧ).

У телят 1-й группы, у которых появлялись клинические признаки респираторной патологии, отмечали активацию вторичного гуморального иммунного ответа: увеличение уровня IgG в крови на 28,9 %, в отличие от снижения такового у телят 2-й и 3-й групп на 25,7 и 12,4 % соответственно.

Вместе с тем у них увеличивалось содержание мРНК интерлейкинов в крови и в носовых выделениях. Экспрессия IL-1 и INF γ возрастала в большей степени, чем медиаторов, регулирующих клеточный и гуморальный иммунитет, что подтверждало возникновение воспалительного процесса и первичной ответной реакции организма на воздействие инфекционных агентов. Отмечали также увеличение экспрессии генов IL-8 и IL-12 (активаторы макрофагов и нейтрофилов), соответственно в очаге воспаления, а более высокая экспрессия IL-2 в крови и носовых смывах, чем IL-4, свидетельствовало о преимущественной напряженности клеточного звена иммунной системы.

У животных 2-й группы в этот период значительных изменений в активности генов цитокинов не выявлено. У них несколько повысилась активность IL-1 в носовых выделениях, IL-2 в крови, а также отмечали невысокую экспрессию IL-8 и IL-12 в носовых выделениях. У телят 3-й группы наблюдали значительное увеличение экспрессии IL-4 в лейкоцитах крови и повышение содержания мРНК IL-2 и IL-12, что при отсут-

Таблица 1.

Показатели иммунного статуса телят

Показатели	Дни после транспортировки				
	2	8	15	22	28
Телята первой группы					
БАСК, %	44,2±3,77	76,2±2,38	50,4±6,25	53,5±4,53	61,1±1,25
ЛАСК, мг/л	0,03±0,017	0,12±0,012	0,16±0,018	0,25±0,053	0,18±0,027
КАСК, %	3,6±0,61	4,5±0,54	4,4±0,28	4,1±0,32	5,1±0,67
ФАЛ, %	77,5±2,5	66,0±1,41	70,5±2,2	69,0±0,58	78,0±2,87
ФЧ	7,6±0,32	5,7±0,39	6,5±0,24	5,9±0,61	7,2±0,23
ФИ	9,2±0,37	8,9±0,5	9,2±0,24	8,5±0,84	9,2±0,49
IgG, г/л	8,7±1,56	11,3±0,89	13,8±0,97	20,0±3,54	11,3±2,78
IgM, г/л	1,9±0,25	1,9±0,32	2,2±0,44	2,5±0,56	3,4±0,63
Телята второй группы					
БАСК, %	45,6±0,78	74,8±3,83	65,3±3,44	61,3±5,92	66,0±2,89
ЛАСК, мг/л	0,03±0,001	0,13±0,017	0,13±0,01	0,22±0,038	0,19±0,049
КАСК, %	2,8±0,68	4,4±1,0	3,6±0,33	3,0±0,15	5,2±0,39
ФАЛ, %	74,0±4,0	64,0±0,01	73,0±3,0	71,0±0,58	78,0±8,0
ФЧ	6,3±0,01	6,3±0,66	5,7±0,32	6,6±0,6	7,4±0,2
ФИ	8,5±0,44	9,8±1,03	8,6±0,35	9,9±0,42	9,6±1,25
IgG, г/л	8,8±1,25	7,0±0,5	14,3±2,75	18,6±3,6	13,1±5,95
IgM, г/л	2,0±0,01	2,0±0,04	2,1±0,14	2,1±0,14	2,4±0,01
Телята третьей группы					
БАСК, %	48,3±7,95	80,1±5,87	72,7±3,74	62,4±1,96	62,1±1,43
ЛАСК, мг/л	0,07±0,009	0,16±0,001	0,17±0,021	0,18±0,011	0,18±0,006
КАСК, %	4,7±0,33	4,5±0,63	4,4±0,21	3,4±0,22	6,4±0,49
ФАЛ, %	76,0±4,0	66,0±2,0	68,0±4,0	70,0±2,0	78,0±3,0
ФЧ	7,0±0,68	6,9±0,06	6,8±0,18	5,4±0,25	7,3±1,28
ФИ	8,8±0,89	10,0±1,24	9,8±0,28	6,7±0,01	8,2±0,67
IgG, г/л	12,7±5,5	11,3±3,75	22,5±2,5	13,3±1,75	14,9±1,1
IgM, г/л	2,1±0,29	2,5±0,5	2,9±0,94	2,6±0,79	2,8±0,6

ствии у них клинических признаков болезни могло быть связано с предшествующей вакцинацией.

В конце второй недели опыта респираторная патология проявилась у животных 2-й группы. У них отмечали снижение КАСК, но более выраженный вторичный гуморальный иммунный ответ. Уровень IgG в крови увеличился в 2,04 раза, что было выше, чем у телят 1-й и 3-й групп (в 1,22 и 1,99 раза). Повысилась фагоцитарная активность лейкоцитов, хотя поглотительная способность их (ФЧ и ФИ) снизилась, что могло быть следствием антигенной нагрузки на фагоцитарное звено.

О начальной стадии воспалительного процесса у этих телят свидетельствовало также

повышение экспрессии генов цитокинов в лейкоцитах крови и носовых выделений. При этом содержание мРНК провоспалительного – IL-1 и цитокинов первичного ответа (INF γ , TNF- α) было одинаково высоким. Активность генов цитокинов, отвечающих за клеточный и гуморальный иммунитет, была несколько ниже, чем медиаторов первичного ответа, что объясняется более поздней активацией их экспрессии.

Наиболее высокую активность генов цитокинов в лейкоцитах крови и носовых выделений (IL-1, IL-2, IL-8, IL-12, INF γ и TNF- α) в этот период отмечали у телят 1-й группы, заболевших в конце первой недели после поступления на комплекс, что свидетельство-

Таблица 2.

Экспрессия генов цитокинов в лейкоцитах крови / носовых смывах телят

Показатели	Дни после транспортировки				
	2	8	15	22	28
Телята первой группы					
IL-1	100/1000	500/5000	1000/5000	500/1000	1000/500
IL-2	100/100	1000/1000	1000/1000	1000/1000	500/500
IL-4	100/0	250/10	500/250	500/250	1000/500
IL-8	100	1000	1000	1000	500
IL-12	0	500/1000	1000/500	500/500	250/10
INF γ	500/1000	1000/5000	500/1000	500/500	500/500
TNF- α	500/1000	1000/1000	1000/1000	500/1000	500/500
Телята второй группы					
IL-1	10/100	100/500	1000/1000	500/1000	250/500
IL-2	10/10	100/0	500/500	1000/2500	500/1000
IL-4	0	0	100/250	500/500	1000/500
IL-8	0	10	500	1000	1000
IL-12	10/0	0/100	250/250	1000/250	250/250
INF γ	0/100	100/100	250/1000	250/500	500/1000
TNF- α	100/100	100/100	500/1000	1000/500	500/500
Телята третьей группы					
IL-1	0/100	0/10	0	500/1000	500/1000
IL-2	10/10	100/0	250/100	1000/1000	1000/500
IL-4	10/0	500/0	500/250	1000/500	2500/500
IL-8	0	0	100	500	1000
IL-12	0	100/0	100/100	100/250	250/100
INF γ	0/10	10/100	10/500	500/1000	250/500
TNF- α	10/100	100/100	100/250	2500/5000	500/2500

Примечание: показатель отражает величину разведения кДНК в реакции, в которой получен положительный сигнал; мРНК интерлейкина-8 обнаруживалась только в лейкоцитах носовых смывов.

вало о развитии ответной реакции организма животных, а также активацию фагоцитарного звена – увеличение показателей ФАЛ, ФЧ и ФИ в сочетании с повышением уровня лизоцима в сыворотке крови.

У животных 3-й группы возросла экспрессия в лейкоцитах крови IL-2 и IL-4, свидетельствующая о стимуляции клеточного и гуморального звена иммунной системы, а увеличение содержания в носовых смывах мРНК активаторов макрофагов и нейтрофилов (IL-8 и IL-12) и цитокинов первичного ответа (INF γ и TNF- α) предполагает усиление антигенного воздействия и миграцию в слизистую оболочку верхних дыхательных путей активированных иммунокомпетентных клеток.

Появление у телят 3-й группы в конце третьей недели клинических признаков респираторной патологии сопровождалось угнетением гуморальных факторов неспецифической защиты и иммунной защиты, а также поглотительной способности лейкоцитов. Снижение БАСК произошло на 14,2 %, КАСК – 22,7 %, IgG – 69,2 %, IgM – 11,3 %, а показателей ФЧ и ФИ – на 20,6 и 31,6 % соответственно.

Отмеченная отрицательная динамика уровня естественной резистентности, IgG и IgM в крови телят могла быть следствием длительного антигенного воздействия, что обусловило возникновение иммунодепрессивного состояния. Снижение уровня иммуноглобулинов не сочеталась с повышением

содержания мРНК IL-4 в лейкоцитах крови, способствующего трансформации В-клеток в антителопродуценты, что свидетельствовало о дисбалансе функционирования иммунной системы. При этом в лейкоцитах крови и носовых выделениях значительно увеличивалась активность провоспалительного цитокина – IL-1.

Напротив, у животных 1-й и 2-й групп, вследствие обострения хронического воспалительного процесса, в этот период произошло увеличение уровня IgG на 44,9 и 30,1 % и лизоцима – на 56,3 и 69,2 % соответственно.

У них снизилась, но оставалась высокой экспрессия провоспалительных интерлейкинов и цитокинов первичного ответа, а у телят 2-й группы увеличивалось содержание мРНК медиаторов клеточного и гуморального звена иммунной системы.

На 28 день исследований у животных всех групп отмечали заметное увеличение показателей фагоцитоза и общей гемолитической активности комплемента сыворотки крови, а у телят 1-й и 2-й групп – также повышение БАСК и снижение ЛАСК. После предшествующей стадии обострения хронического воспалительного процесса у животных 1-й и 2-й групп произошло значительное снижение уровней IgG в крови и более выраженное увеличение концентрации IgM, чем у телят 3-й группы, у которых, напротив, повысилось содержание IgG. Наблюдавшиеся различия смены фаз первичного и вторичного гуморального иммунного ответа, очевидно, были обусловлены разными сроками рецидивов респираторной патологии у подопытных животных.

У телят 1-й группы отмечали увеличение экспрессии IL-1 в лейкоцитах крови, содержания мРНК интерлейкина-8 при снижении активности генов, отвечающих за клеточный иммунитет и первичную реакцию организма.

У животных 2-й группы, напротив, экспрессия генов IL-1 и цитокинов первичного ответа снизилась, но была достаточно высокой активность генов IL-8 и IL-2 в лейкоцитах носовых смывов, что указывает на напряженность клеточного звена иммунитета в очаге воспаления.

У телят 3-й группы снизилась активность генов INF γ и TNF- α , при этом увеличилась экспрессия генов IL-4, активирующего макрофаги и стимулирующего продукцию антител, в лейкоцитах крови – мРНК IL-12, была высокой экспрессия гена IL-8 в носовых смывах, способствующего активации и миграции нейтрофилов в очаг воспаления.

Заключение

Таким образом, проведенными исследованиями установлено, что исходное состояние иммунной системы влияет на выраженность ответной реакции организма при воздействии экстремальных факторов (транспортный стресс, изменившиеся условия содержания и кормления, вакцинация, воздействие потенциальных возбудителей инфекции) и имеет не только диагностическое, но и прогностическое значение у животных, предрасположенных, в частности, к возникновению респираторной патологии.

У телят с более высокими показателями иммунного статуса клинические признаки респираторной патологии появлялись позже, чем у животных со сниженной функцией иммунной системы, что свидетельствует о лучшей адаптации их к воздействию неблагоприятных факторов внешней среды и способствует подготовке иммунной системы к формированию адекватного ответа, обуславливающего снижение тяжести течения болезни.

Список литературы

1. Басова, Н. Ю. Распространение респираторных болезней молодняка крупного рогатого скота в Краснодарском крае / Н. Ю. Басова, А. Г. Шипицын, В. В. Бель // «Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях». Международная научно-практическая конференция. Воронеж, 23–25 сентября 2002 г. : [материалы]. – Воронеж : Воронежский государственный университет, 2002. – С. 129–130.
2. Глотов, А. Г. Распространение вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота / А. Г. Глотов, О. Г. Петрова, Т. И. Глотова и др. // Ветеринария. – 2002. – № 3. – С. 17–21.
3. Красочко, П. А. Современные подходы к специфической профилактике вирусных респираторных и желудочно-кишечных инфекций крупного рогатого скота / П. А. Красочко, И. А. Красочко, С. Л. Борознов // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. Материалы научной конференции «Инфекцион-

ная патология животных». Т. VI. – Владимир : Транзит, ИКС, 2008. – 379 с.

4. Методические рекомендации по оценке и коррекции неспецифической резистентности животных. – Воронеж, 2005. – 62 с.

5. Сисягин, П. Н. Профилактика вирусных респираторных болезней телят / П. Н. Сисягин, Г. Р. Реджепова, И. В. Убитина, Г. В. Зоткин // «Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях». Международная научно-практическая конференция. Воронеж, 23–25 сентября 2002 г. : [материалы]. – Воронежский государственный университет, 2002. – С. 38–40.

6. Тихомирова, Л. М. Иммунологические основы течения болезней легких у телят / Л. М. Тихомирова // Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях. Международная научно-практическая конференция. Воронеж, 17–19 сентября 2008 г. : [материалы]. – Воронеж : Исток, 2008. – С. 253–255.

7. Федоров, Ю. Н. Иммунодефициты крупного рогатого скота / Ю. Н. Федоров // Ветеринария. – 2006. – № 1. – С. 3–6.

8. Groot, J. de. Age, gender and litter-related variation in T-lymphocyte cytokine production in young pigs / J. de Groot, L. Kruijt, J. W. Scholten, W. J. A. Boersma, W. G. Buist, . G. van Reenen // Immunology. – 2005. – Vol. 114. – P. 495–505.

9. Portgieter, L. N. D. Immunosuppression in cattle as a result of bovine viral diarrhea virus infection / L. N. D. Portgieter // Agri. Pract. – 1988. – V. 9. – P. 7–14.

10. Sacco, R. E. Differential Expression of Cytokines in Response to Respiratory Syncytial Virus Infection of Calves with High or Low Circulating 25-Hydroxyvitamin D3 / R. E. Sacco, B. J. Nonnecke1, M. V. Palmer, W. R. Waters, J. D. Lippolis, T. A. Reinhardt // PLoS. – 2012. – Vol. 7. – Is. 3, e33074.



 **ВЕТЕРИНАР.ru**
Всё о ветеринарии для врачей и владельцев животных

реклама

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

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

Приглашаем к сотрудничеству ветеринарных врачей и организации.
e-mail: invet@inbox.ru boldyрева@mail.ru
тел.: 8 (909) 646-76-43, 8 (916) 181-95-58

УДК 578.821.52:57.083.24:57.083.224

Ключевые слова: вирус, оспа мышей, культура клеток, пассаж, реакция диффузионной преципитации

Key words: virus, mousepox, cell culture, passage, diffusion precipitation reaction

Жилин Е. С., Русанова А. М., Червякова О. В., Зайцев В. Л., Кошеметов Ж. К., Булатов Е. А.

ВЫДЕЛЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВИРУСА ОСПЫ МЫШЕЙ *ISOLATION, IDENTIFICATION AND STUDY OF SOME BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE MOUSEPOX VIRUS*

РГП Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности (НИИПББ) КН МОН РК

Адрес: 080409, Республика Казахстан, Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский

RGE Research Institute for Biological Safety Problems (RIBSP) SC ME&S RK

Address: 080409, Republic of Kazakhstan, Zhambylskaya oblast, Kordaiskiy region, pgt. Gvardeiskiy

Жилин Евгений Сергеевич, зав. лабораторией «Методы и технологии консервирования биопрепаратов»

Zhilin Evgeniy S., Head of the Laboratory "Biopreparations preservation methods and technology"

Русанова Анастасия Михайловна, к. б. н., ст. научн. сотрудник

Rusanova Anastasia M., Ph.D., Ph.D., Senior Staff Scientist

Червякова Ольга Викторовна, к. б. н., ст. научн. сотрудник

Chervyakova Olga V., Ph.D., Senior Staff Scientist

Зайцев Валентин Лукьянович, к. б. н., вед. научн. сотрудник

Zaitsev Valentin L., Ph.D., Chief Staff Scientist

Кошеметов Жумагали Каукарбаевич, к. б. н., зав. лабораторией «Диагностика и индикация вирусных инфекций»

Koshemetov Zhumagali K., Ph.D., Head of the Laboratory "Infectious diseases diagnostics and indication"

Булатов Ербол Аkenович, к. б. н., ст. научн. сотрудник

Bulatov Yerbol A., Ph.D., Senior Staff Scientist

Аннотация. В статье представлены результаты экспериментов по выделению, идентификации и изучению некоторых биологических свойств вируса оспы мышей. Установлена возможность репродукции вируса оспы мышей с проявлением выраженного цитопатического действия в первичной культуре клеток почек ягненка. Инфицирование культуральными суспензиями инициировало у мышей развитие оспоподобных поражений, некроза конечностей и гибель животных. Вирус 20-кратно пассированный в культуре клеток почек ягненка, сохранил свои патогенные свойства для белых мышей. Установлено антигенное родство выделенного изолята вируса оспы мышей с вирусами оспы коров, овец, коз, кур.

Summary. The given article presents the results of experiments on the isolation, identification and study of some biological properties of the mousepox virus. The possibility of reproduction of mousepox virus with expressed cytopathic effect in primary cell culture of lamb kidney had been established. Infection of mice with culture suspensions initiated development of varioloid lesions, necrosis of extremities and death of animals. 20-fold passed virus in cell culture of lamb kidney kept its pathogenicity for white mice. The antigenic similarity of isolates of the mousepox virus with viruses of cowpox, sheep-pox, goat-pox and chicken-pox had been established.

Введение

Оспа мышей (*variola murina*, инфекционная экстромелия) – инфекционная вирусная болезнь мышей и крыс. Патогенез оспы мышей сходен с патогенезом натуральной оспы человека, который предполагает быструю репликацию вируса в первоначальном месте проникновения, как правило, кожи, а также быстрым распространением вируса кровью во внутренние органы, вторичной репликацией вируса в селезенке и печени и, наконец, распространением на кожу, что сопровожда-

ется типичной сыпью, характерной для других вирусов рода *Orthoroxvirus* [5].

При острой форме течения болезни животные погибают без видимых признаков болезни через 5–14 сут. Смертность, в зависимости от вирулентности штамма, достигает 50–100 %. Для хронической формы характерны поражения кожи и мышц конечностей, результатом которых являются отеки и гнойничковые высыпания, из которых выделяется серозная жидкость, образующая после подсыхания корочки, напоминающие

оспины у людей. Часто возникает некроз, гангрена, отпадение конечностей с образованием округлой культи. Кроме конечностей поражаются хвост, уши, мордочка и различные участки кожи [3].

Диагноз ставят на основании эпизоотологических, клинических, патологоанатомических данных и результатов лабораторного исследования [6]. Антигены вируса оспы мышей имеют родственные связи с антигенами вирусов оспы коров, осповакцины, оспы обезьян [7]. Лечение не разработано. Для профилактики обязательно карантинирование вновь завозимых животных.

Оспа мышей – широко распространенное заболевание в питомниках многих стран, где разводят лабораторных животных. Заболевание протекает спорадически, но часто поражаются все животные в эпизоотическом очаге. Экстремелия может приводить к контаминации вакцинных и вирулентных штаммов вирусов, пассируемых на белых мышах.

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности по роду своей деятельности занимается изоляцией и поддержанием различных вакцинных и вирулентных штаммов вирусов. Для исследований ряда вирусных агентов в качестве чувствительной модели используются лабораторные мыши, что не исключает контаминацию материалов вирусом оспы мышей. Так, при проведении серии экспериментов по освежению вакцинного вируса бешенства на мышах был получен биоматериал из мозга, в препаратах которого методом электронной микроскопии обнаружены вирионы, морфологически сходные с вирусами рода *Orthorovirus*. Для идентификации вирусного агента были проведены исследования по его изоляции на чувствительных системах.

Материалы и методы

В качестве исходной суспензии использовали 20%-ю мозговую суспензию мыши, в препаратах которой при электроно-микроскопических исследованиях были обнаружены вирионы, морфологически сходные с вирусами рода *Orthorovirus*.

Для изоляции вирусного агента использовали беспородных мышей и культуру клеток

почек ягнят (ПЯ) (Банк первичных и перевиваемых культур клеток НИИПББ).

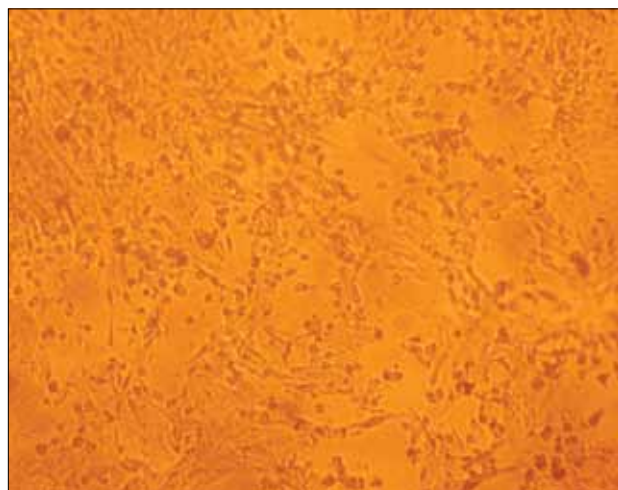
Для заражения культур клеток 20%-ю суспензию мозга мыши подвергали центрифугированию при 3000 об./мин, 20 мин. Надосадов в объеме 0,1 см³ вносили в пробирку с монослоем клеток ПЯ и инкубировали в течение 60 мин. Удаляли вирусный материал и вносили пристеночную полусинтетическую среду (1,0 % глютамина, 2,0 % инактивированной сыворотки крупного рогатого скота, 100 МЕ сульфата гентамицина). Культивирование вируса осуществляли при 37 °С. Контроль репродукции вируса проводили визуально по цитопатическому действию (ЦПД) вируса на клетки. Инфекционную активность вируса определяли по ЦПД в культуре клеток ПЯ. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча в модификации Ашмарина и выражали в lg ТЦД₅₀/см³ [1].

Тканевыми и культуральными суспензиями вируса заражали мышей интрацеребрально в дозе 0,03 см³, внутрибрюшинно – 0,5 см³, внутрикожно – 0,1 см³. Наблюдение за животными проводили в течение 21 суток.

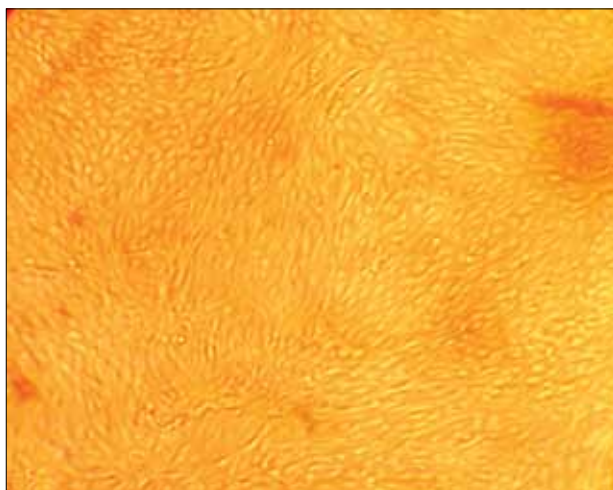
Контроль наличия вируса в культуральных суспензиях и патологических материалах проводили электронной микроскопией методом негативного контрастирования. Культуральные и тканевые антигены исследовали в реакции преципитации со специфическими сыворотками при оспе коров, овец, коз, кур, контагиозной эктине овец, хламидиозе, болезни Ауески, катаральной лихорадке овец, чуме мелких жвачных животных (коммерческие препараты, изготавливаемые в НИИПББ). В качестве контроля использовали нормальную сыворотку овцы. Постановка реакции преципитации осуществлялась по методу Ouchterlony [9].

Результаты и обсуждение

С целью выделения вирусного агента использовали белых мышей и культуру клеток ПЯ. Интрацеребральное и внутрибрюшинное заражение мышей мозговой суспензией вируса приводило к их гибели через 7–10 суток после заражения без клинических проявлений заболевания животных. Внутрикожное введение вирусного материала и исполь-



а

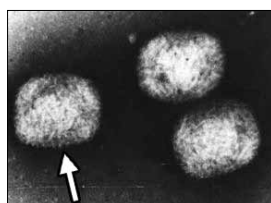


б

Рис. 1. Световая микроскопия инфицированной и неинфицированной культуры клеток ПЯ (Инстр. ув. $\times 200$): а – деструктивные изменения культуры клеток ПЯ, 5 сутки после инфицирования; б – незараженная культура клеток ПЯ, 5 сутки инкубирования.

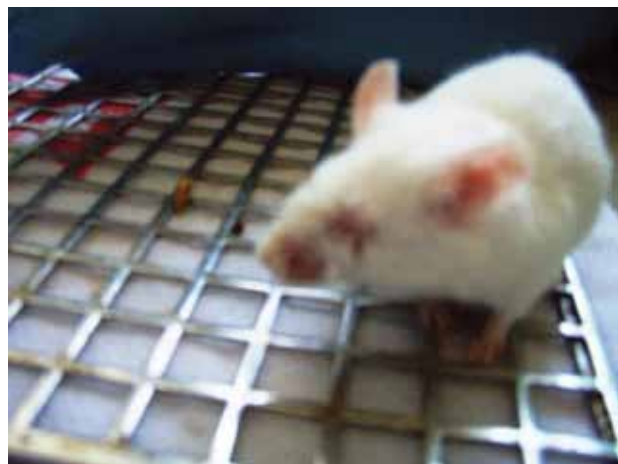


а



б

Рис. 2. Электронная микроскопия препаратов: а – увеличение $\times 50000$; б – увеличение $\times 200000$.



а



б



в



г

Рис. 3. Клинические признаки заболевания у инфицированных мышей: а – конъюнктивит глаз, б – отеки конечностей, в – пустулезная сыпь, г – некроз тканей конечностей, отсутствие фаланг пальцев.

зование для последующих 4 пассажей на мышках мозговых суспензий павших мышей при различных способах введения не приводило к заболеванию и гибели животных в течение всего срока наблюдения.

При инфицировании культуры клеток ПЯ на втором пассажном уровне на 3 сутки культивирования обнаружены деструктивные изменения клеточного монослоя, проявлявшиеся в виде небольшого разрежения монослоя, окруженного округлыми светопреломляющими клетками. Количество очагов и площадь деструктивного поражения клеток увеличивались к 10 пассажному уровню, наблюдалось 80–90%-е поражение клеточного монослоя (рис. 1а). Начало поражения клеток выявлялось на 2 сутки, максимальное поражение клеточного монослоя установлено на 5 сутки. В монослое незараженных клеток подобных изменений не отмечали (рис. 1б).

При электронно-микроскопическом исследовании препаратов культуральной суспензии 10 пассажного уровня были обнаружены единичные вирусные частицы и скопления вирионов. Вирионы имели морфологическую характеристику, типичную (кирпичеобразную) для рода *Orthoroxvirus* (рис. 2а). Диаметр вирусных частиц варьировал в пределах 200–250 нм, длина составляла 250–300 нм. Многослойная оболочка вируса толщиной 20–25 нм была покрыта многочисленными полыми трубкообразными структурами диаметром 5–7 нм и длиной 18–20 нм (рис. 2б).

Суспензией 10-пассажного уровня были инфицированы 3 группы животных по 10 мышей в каждой. В результате проведенного опыта было установлено, что интрацеребральное и внутрибрюшинное введение культуральной суспензии вызывало гибель всех животных (1, 2 группа животных) на 5–10 сутки после заражения. Клинических симптомов заболевания при этом не отмечали. При внутрикожном введении вируса в область хвоста на 7 сутки отмечено появление конъюнктивита глаз (рис. 3а) и отеков конечностей (рис. 3б) с последующим появлением на 10 сутки пустулезной сыпи, из которой происходило выделение серозного экссудата (рис. 3в). После спадания отеков на месте

пустул образовывались язвочки и корочки. Через 15 суток после заражения наблюдали некроз тканей конечностей с последующим отпадением фаланг пальцев и конечностей с образованием культи (рис. 3г). Все вышеописанные симптомы соответствовали клиническому течению и поражениям, развивающимся при оспе мышей, приведенным в литературе [2, 8].

Мыши, павшие после заражения, были подвергнуты патологоанатомическому вскрытию. В результате вскрытия установлено наличие кровоизлияний в верхнем отделе кишечника и легких, увеличение печени и селезенки, при гистологическом исследовании найдены цитоплазматические включения в клетках эпидермиса кожи и печени, что также соответствует патогенезу оспы мышей [3, 4, 5].

Пробы органов (мозг, печень, селезенка, легкие, кишечник в виде 20%-х суспензий) павших мышей, а также антигены, полученные из инфицированных клеток 10 пассажного уровня, были исследованы в реакции преципитации со специфическими сыворотками при оспе коров, овец, коз, кур, контактной эктиме овец, хламидиозном аборте овец, болезни Ауески, катаральной лихорадке овец и нормальной овечьей сыворотке.

Результаты исследований отражены в таблице. Из таблицы видно, что антигены, полученные из инфицированных клеток ПЯ и печени павших животных, реагировали положительно со специфическими сыворотками при оспе коров, овец, коз, кур при отрицательных результатах с другими гетерологическими сыворотками, что свидетельствует о наличии антигенных связей с вирусами рода *Orthoroxvirus* и *Capripoxvirus*.

При проведении дальнейшего пассирования вируса (10 пассажей) в культуре клеток ПЯ наблюдалось сохранение выраженного цитопатогенного действия вируса на клеточный монослой. В вирусных материалах выборочных пассажей определена инфекционная активность вируса. В результате установлено, что при выбранных условиях культивирования титры вируса в культуральных суспензиях 11–20 пассажного уровня составляли $5,5 \div 6,26 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Независимо

Результаты исследований тканевых и культуральных проб в реакции диффузионной преципитации

№ п/п	Наименование исследуемых проб	Контрольные сыворотки									
		СС оспы коз	СС ОО	СС оспы коров	СС оспы кур	СС КЭО	СС ХАО	СС ЧМЖЖ	СС КЛО	СС Ауе- ски	СН
1	Мозг	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Легкие	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Печень	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
4	Кишечник	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Селезенка	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	АгС оспа мышей на ПЯ (100 раз концен- трированный)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
7	АгС ОО	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
8	АгС оспа коров	+	н/и	+	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и
9	АгС болезни Ауески	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
10	АгС КЛО	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
11	АгС КЭО	н/и	н/и	н/и	н/и	+	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и
12	АгС оспа кур	н/и	н/и	н/и	+	н/и	-	н/и	н/и	н/и	н/и
13	АгС ЧМЖЖ	н/и	-	н/и	н/и	н/и	н/и	+	-	-	-
14	АгН ПЯ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: СС – сыворотка специфическая; СН – сыворотка нормальная; АгС – антиген специфический; АгН – антиген нормальный; КЭО – контагиозная эктима овец; ХАО – хламидиозный аборт овец; КЛО – катаральная лихорадка овец; ОО – оспа овец; ЧМЖЖ – чума мелких жвачных животных; «+» – положительный результат; «-» – отрицательный результат; «н/и» – не исследовали.

от пассажного уровня вирус сохранял патогенные свойства для мышей при различных методах инфицирования.

Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что вирус оспы мышей успешно культивируется в первичной культуре клеток почек ягненка с проявлением выраженного цитопатического действия. При заражении мышей исследуемый вирус вызывает развитие характерных для инфекционной эктромелии клинических признаков и патологоанатомических изменений. В антигенном отношении изолированный вирус близкородственен к вирусам родов Orthopoxvirus и Capripoxvirus. Совокупность клинических, патоморфологических признаков и морфометрических антигенных свойств выделенного изолята позволяет идентифицировать

изолированный вирусный агент как вирус оспы мышей.

Список литературы

1. Ашмарин, И. П. Статистические методы в микробиологии / И. П. Ашмарин, А. А. Воробьев. – Л. : Медгиз, 1962. – 180 с.
2. Сенкевич, Т. Г. Рекомбинанты вирусов осповакцины и эктромелии, вызывающие характерные для вируса эктромелии поражения у мышей / Т. Г. Сенкевич, Р. Р. Арасланов, Т. С. Вовк и др. // Молекул. генетика, микробиология и вирусология. – 1989. – № 8. – С. 20–23.
3. Allen, A. M. Pathology and diagnosis of mousepox / A. M. Allen, G. L. Clarke, J. R. Ganaway et al. // Laboratory Animal Science. – 1981. – 31. – P. 599–608.
4. Baker, D. G. Natural Pathogens of Laboratory Mice, Rats, and Rabbits and Their Effects on Research / D. G. Baker // Clinical Microbiology Reviews. – 1998. – Vol. 11. – No. 2. – P. 231–266.
5. Chaudhri, G. Obligatory requirement for antibody in recovery from a primary poxvirus infection / G. Chaudhri,

V. Panchanathan, H. Bluethmann, G. Karupiah // J. Virol. – 2006. – 80 (13). – P. 6339–44.

6. Esteban, D. J. Ectromelia virus: the causative agent of mousepox / D. J. Esteban, R. M. Buller // J. Gen. Virol. – 2005. – 86. – P. 2645–2659.

7. Fenner, F. The Orthopoxvirus / F. Fenner, R. Wittek, K. Dumbell. – London : Academic Press, 1989.

8. Krzyzowska, M. Mousepox conjunctivitis: the role of Fas/FasL-mediated apoptosis of epithelial cells in virus dissemination / M. Krzyzowska, M. Polanczyk, M. Bas, J. Cymerys et al. // J. Gen. Virol. – 2005. – 86. – P. 2007–2018.

9. Ouchterlony, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis / O. Ouchterlony // Prog. Allergy. – 1962. – 6. – P. 3–15.

НОУ ДО «Институт Ветеринарной Биологии» приглашает принять участие в семинарах в 2012/2013 учебном году:

«Рентгенодиагностика мелких домашних животных»



«УЗИ-диагностика мелких домашних животных»

Семинар проводится с 2009 года. Состоит из теоретической и практической частей. В курсе теории слушатели знакомятся с терминологией, физическими и техническими аспектами рентгеновского излучения, общими принципами работы рентгеновского аппарата, рентгенологической фотохимией, характеристикой рентгенодиагностики исследуемых органов, укладками для рентгенографического исследования отдельных анатомических областей, картиной в норме и при патологии.

За время практических занятий в рентгеновском кабинете каждый участник семинара обучается самостоятельно изготавливать рентгеновский снимок. Большая часть семинара посвящена развитию практических навыков – чтению рентгеновских снимков. На примере более чем 2000 снимков из архива Института Ветеринарной Биологии подробно описывается норма и патология скелетных структур, органов грудной клетки и органов брюшной полости.

По окончании курсов слушатели проходят тестовое занятие по комплексному чтению рентгеновских снимков и получают соответствующие сертификаты.

Курс рассчитан на слушателей с базовым ветеринарным образованием. Курсы пятидневные, с 11.00 до 17.00. Форма оплаты: безналичный расчет.

График проведения

2012 год: 1–5 октября, 26–30 ноября

2013 год: 21–25 января, 18–22 марта, 13–17 мая

Семинар проводится совместно с НПП «Ратекс» с 2006 года. Включает в себя теоретическую и практическую программы. В курсе теории слушатели знакомятся с общими принципами работы УЗ-аппаратов, датчиков, возможностями визуализации изображения внутренних органов брюшной полости, правилами укладки животных.

Отдельное занятие посвящено системам управления приборами УЗИ, правильному выбору настроек, созданию архивов и выдаче заключения.

За время проведения практических занятий каждый участник семинара обучается самостоятельно находить все органы брюшной полости, подлежащие визуализации, правильно их описывать, различать норму и патологию. Особое внимание уделяется развитию визуальных практических навыков – чтению эхограмм.

По окончании курсов слушатели проходят тестовое занятие и получают соответствующие сертификаты.

Базовый курс рассчитан на слушателей, начинающих обучение с нуля. Курсы пятидневные, с 11.00 до 17.00.

Для иногородних бронируется гостиница или общежитие. Форма оплаты: безналичный расчет.

График проведения

2012 год: 17–21 сентября, 15–19 октября, 12–16 ноября, 10–14 декабря

2013 год: 4–8 февраля, 4–8 марта, 1–5 апреля, 29 апреля – 3 мая, 27–31 мая

Для записи на семинары обращайтесь по тел. +7 921 095-89-27, (812) 927-55-92

Интересующие вас вопросы можно уточнить по электронной почте: invetbio@yandex.ru

Вся информация о семинарах (график и место проведения, стоимость, программа занятий, отзывы слушателей) доступна на сайте: www.invetbio.spb.ru/seminars.html

УДК 578.832.1.083.3

Ключевые слова: вирус гриппа лошадей, реакция гемагглютинации, иммуноферментный анализ, реакция диффузионной преципитации, матричный белок

Key words: *Equine influenza virus, hemagglutination reaction, immune-enzyme analysis, diffusion precipitation reaction, matrix protein*

Матвеева В. М., Кошметов Ж. К., Бурабаев А. А., Нурабаев С. Ш.

ПОЛУЧЕНИЕ АНТИСЫВОРОТОК К ВИРУСУ ГРИППА ЛОШАДЕЙ ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ *OBTAINING OF ANTISERUM FOR SERUM DIAGNOSIS AND IDENTIFICATION OF EQUINE INFLUENZA VIRUS AGENT*

РГП Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности (НИИПББ) КН МОН РК

Адрес: 080409, Республика Казахстан, Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский

RGE Research Institute for Biological Safety Problems (RIBSP) SC ME&S RK

Address: 080409, Republic of Kazakhstan, Zhambylskaya oblast, Kordaiskiy region, pgt. Gvardeiskiy

Матвеева Валентина Михайловна, к. б. н., ст. научн. сотрудник

Matveeva Valentina M., Ph.D., Senior Staff Scientist

Кошметов Жумагали Каукарбаевич, к. б. н., зав. лабораторией «Диагностика и индикация вирусных инфекций»

Koshemetov Zhumagali K., Ph.D., Head of the Laboratory "Infectious diseases diagnostics and indication"

Бурабаев Асылбек Амирбекович, к. б. н., ст. научн. сотрудник

Burabaev Asylbek A., Ph.D., Senior Staff Scientist

Нурабаев Сергазы Шуратбаевич, ст. научн. сотрудник

Nurabaev Sergazy Sh., Senior Staff Scientist

Аннотация. В настоящей работе представлены результаты по получению активных и специфичных антисывороток к вирусу гриппа лошадей (ВГЛ) на козах и кроликах, пригодных для разработки и производства диагностических тест-систем с целью обнаружения и идентификации выделяемых изолятов вируса гриппа лошадей.

В результате проведенных исследований были подобраны оптимальные способы очистки и концентрирования ВГЛ и выделения типоспецифических (NP и M1) белков из очищенных препаратов вируса.

С применением этих препаратов разработаны оптимальные схемы получения активных и специфичных антисывороток против данных штаммов вируса гриппа лошадей и его внутренних белков. Приготовленные антисыворотки пригодны для разработки и производства отечественных диагностических тест-систем с целью обнаружения типоспецифического антигена А и идентификации выделенных изолятов вируса гриппа лошадей.

Summary. *In the given paper the results of obtaining the active and specific antiserum to equine influenza virus suitable for the development and production of diagnostic kits for the detection and identification of equine influenza virus isolates are presented.*

In the result of the research the most optimal ways of purification and concentration of equine influenza virus and ways of allocation the type specific (NP and M1) proteins from purified virus preparations were chosen.

With the use of these preparations optimum layouts for obtaining the active and specific antiserum to the given strains of equine influenza virus and to its internal proteins were developed. Prepared antiserum is suitable for the development and production of domestic diagnostic kits which are useful for the detection of type specific antigen and equine influenza virus isolates.

Введение

Несомненную важность для эпизоотологической службы Казахстана, а также для биологической безопасности страны, наряду с опасными заболеваниями, такими как грипп птиц, ящур, сибирская язва, оспа овец, чума мелких животных, представляют «возвращающиеся» инфекционные заболевания, к которым относится грипп лошадей. Грипп лошадей также относится к группе опасных вирусных болезней животных [5, 9].

Потенциальная опасность гриппа лошадей вызвана тем, что данное заболевание наряду с гриппом птиц может являться источником появления пандемического штамма гриппа человека. Ежедневные тесные контакты человека с лошастью, высокий мутационный потенциал являются условием для совместного смешивания нескольких штаммов вируса гриппа, обмена генетической информацией и возможным появлением пандемического гриппа для человека [2, 7].

Расширяющиеся международные связи способствуют распространению данной инфекции по всему миру. Поэтому предупреждение заноса и распространения возбудителя этой опасной болезни на территории нашей страны является одной из приоритетных задач.

Эпизоотическая ситуация по гриппу лошадей в Казахстане характеризуется как чрезвычайная и свидетельствует о необходимости проведения в стране оперативных мер по локализации и ликвидации болезни. С другой стороны, как показывает печальный опыт других стран, для которых грипп лошадей стал «вновь возникающей» болезнью, в Казахстане инфекция может стать эндемичной, борьбу с которой необходимо вести среди естественно восприимчивых животных.

В общем комплексе мероприятий по предупреждению заноса и ликвидации особо опасных вирусных болезней сельскохозяйственных животных существенная роль принадлежит лабораторной диагностике и идентификации возбудителей заболевания.

Следует отметить, что в Республике Казахстан до настоящего времени не проводились научно-исследовательские работы по разработке диагностических тест-систем при гриппе лошадей.

Целью наших исследований являлось получение активных и специфичных сывороток к вирусу гриппа лошадей, пригодных для серологической диагностики и типирования данного вируса.

Материалы и методы

Вирус. В работе использовали штаммы А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) и А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) ВГЛ. ВГЛ выращивали в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) согласно установленным регламентам [6]. Инфекционная и гемагглютинирующая активность вируса до инактивации составляла не менее 7,0–7,5 lg ЭИД₅₀ и 1 : 512–1024 соответственно.

Реакция гемагглютинации (РГА). Гемагглютинирующую активность вируса определяли в РГА микрометодом по общепринятому методу [6].

РТГА. Реакцию проводили микрометодом в U-образных лунках 96-луночного планшета фирмы “Costar” (США) для иммунологических исследований согласно рекомендациям МЭБ [12]. Титр антител 1 : 16 и выше считали положительным.

Иммуноферментный анализ (ИФА) ставили в непрямом варианте, по отработанным нами условиям.

Реакцию диффузионной преципитации (РДП) ставили по отработанным нами условиям.

Содержание белка определяли по методу Лоури [11], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы “Sigma” (США).

Тест-система Directigen Flu A. Постановку осуществляли согласно наставлению по применению данной тест-системы.

Животные. В качестве доноров противогриппозных антител к ВГЛ служили козы местной породы в возрасте до одного года, вследствие того что использование высокоспецифичных антисывороток, полученных от этих животных, рекомендовано Экспертным комитетом ВОЗ для уверенного антигенного субтипирования НА и NA и идентификации вируса гриппа А, так как они дают минимальные неспецифические реакции [10]. А также кролики местных пород весом 2–2,5 кг.

Антиген. Иммунизацию животных проводили очищенными препаратами концентрированного ВГЛ и его внутренних белков по отработанным нами способам. В качестве стимулятора иммуногенеза использовали сапонин и монтанид.

Результаты и обсуждение

Для получения активных и специфичных сывороток к ВГЛ необходимо было отработать методы очистки и концентрирования вируса из вируссодержащей аллантоисной жидкости (ВАЖ). Для выделения и очистки вируса из вируссодержащих суспензий нами были испытаны следующие методы:

- осаждение вируса с помощью ПЭГ-6000 в 7%-й конечной концентрации при pH 8,5 с последующим концентрированием его методом ультрацентрифугирования и осветлением низкоскоростным центрифугированием;

- концентрирование вируса методом ультрацентрифугирования и дальнейшей очисткой в градиенте плотности сахарозы.

В результате проведенных исследований нами были подобраны следующие оптимальные условия очистки данного вируса:

- ВАЖ осветляли центрифугированием при 3000g в течение 10 мин., обрабатывали антибиотиками в дозе 1000–2000 Ед./мл. Из осветленной ВАЖ вирус осаждали с помощью ПЭГ-6000 в 7%-й конечной концентрации при pH 8,5 в течение 24 ч при 4 °C с последующим ультрацентрифугированием при 100000g в течение 1 часа и 5000g в течение 10 минут.

Очищенный вирус представлял собой гомогенный препарат, гемагглютинирующая активность его составляла 1 : 102400–204800, при исходной активности вируса 1 : 512 – 1 : 1024, а содержание белка – 970–1100 мкг/мл.

Для проведения идентификации возбудителя гриппа лошадей по гемагглютинирующему свойству необходимым условием является наличие штаммоспецифичных диагностических сывороток вируса гриппа лошадей.

Для получения антисывороток к гемагглютинирующему вирусу гриппа, по литературным данным, используют в основном крыс [1].

Специфические сыворотки к ВГЛ для РТГА и РДП мы в своих опытах получали на козах местной породы.

Нами была отработана схема гипериммунизации коз, которая состояла из трех введений очищенных препаратов штаммов А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) и А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8). ВГЛ в возрастающих дозах внутримышечно в область предлопаточных лимфоузлов с интервалом между введениями в 2 недели в комплексе с сапони-

ном (0,05 %) при втором введении. Оценку активности и специфичности полученных антисывороток проводили в РТГА и РДП.

Результаты проведенных опытов по получению антисывороток к подтипам H7N7 и H3N8 ВГЛ на козах и оценка их активности в серологических тестах представлены в таблице 1. Как видно из результатов этой таблицы, активность антисыворотки к штамму А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ составила в РТГА – 1 : 320 и в РДП 1 : 4, а сыворотки к штамму А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) в РТГА – 1 : 1280 и в РДП 1 : 8. Сыворотки специфичны в РТГА, так как не дают перекрестных реакций с антигенами ВГЛ гетерологических подтипов и с вирусом гриппа А подтипов H1N1 и H5N1.

Таким образом, в результате проведенных опытов получены активные иммунные поликлональные антисыворотки к эпизоотически актуальным для территории Казахстана и республик Средней Азии штаммам А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) и А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) ВГЛ на козах, пригодные для постановки РТГА и РДП.

Для получения активных и специфичных антисывороток к внутренним структурным белкам ВГЛ были проведены исследования по выделению типоспецифических вирусных белков, нуклеопротеидного (NP) и матричного (М), из очищенных препаратов штамма А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ.

В результате проведенных исследований отработана следующая схема выделения белка NP из очищенных препаратов ВГЛ:

- вирус обрабатывали ферментом – бромелаином в течение 24 ч при 37 °C при соотношении вируса и фермента 9 : 1, при этом фермент использовали в концентрации 13 мг/мл. Затем вирус осаждали при 106000 g

Таблица 1.

Оценка активности и специфичности антисывороток, полученных к подтипам H7N7 и H3N8 ВГЛ на козах, в серологических тестах

Наименование антисывороток	Активность и специфичность антисывороток в РТГА с антигенами вируса гриппа, подтипов					Активность антисывороток в РДП
	H7N7	H3N8	H7N1	H5N1	H1N1	
к подтипу H7N7	1/1280	-	1/160	-	-	1/8
к подтипу H3N8	-	1/320	-	-	-	1/4

в течение 90 мин. и ресуспендировали в 4-кратном объеме 0,05М ФБР (от исходного). Разрушение вируса проводили с помощью твин-эфира. Для этого в суспензию вируса добавляли 0,1 % твина-20 и оставляли на холоду в течение 30 мин., помешивая. Затем смешивали вирус и холодный эфир в соотношении 1 : 1 и выдерживали в течение 2 ч при 4 °С, постоянно встряхивая на шуттель-аппарате. Нижнюю слабоопалесцирующую водную фазу отделяли и удаляли остатки эфира выветриванием в течение суток при 4 °С, материал осветляли центрифугированием при 2000g. NP осаждали ультрацентрифугированием при 106000 g в течение 90 мин. Очищенный препарат NP исследовали в РГА и ИФА, а также определяли содержание белка по Лоури. Активность в ИФА очищенных препаратов NP составила 1 : 320 – 1 : 640 и содержание белка – 123–155 мкг/мл.

Для выделения белка М1 использовали метод Жирнова О. П. [13], при котором активность очищенных препаратов белка М1 в ИФА составила 1 : 80 – 1 : 160, а содержание белка – 75–91 мкг/мл.

Специфичность очищенных препаратов NP и М белков подтверждали с помощью

тест-системы Directigen Flu A фирмы “Becton Dickinson” (США).

Антисыворотки к NP и М белкам ВГЛ, по литературным данным, получают на кроликах, крысах и мышах [8]. В наших экспериментах для получения сывороток к внутренним белкам ВГЛ использовали коз и кроликов.

Для получения антисывороток в качестве антигена для иммунизации животных использовали очищенные препараты внутренних белков инактивированного ВГЛ.

Схемы получения антисывороток против NP и М белков ВГЛ представлены в таблице 2.

Оценку активности и специфичности полученных антисывороток проводили методами РДП и ИФА. Результаты проведенных опытов по получению антисывороток к типоспецифическим внутренним белкам ВГЛ на кроликах и козах и оценка их активности и специфичности в серологических тестах представлены в таблице 3.

Как видно из результатов таблицы 3, кроличьи и козьи антисыворотки, полученные к внутренним белкам ВГЛ, были активны в РДП до разведения 1 : 4 – 1 : 8

Таблица 2.

Схемы получения специфических антисывороток против NP и М белков ВГЛ на разных видах животных

№ схемы	Вид животного	Способ введения	Концентрация белка в мкг/см ³	Интервал между введениями, сут.
Получение анти-сывороток про-тив белка NP ВГЛ				
1	Коза	в/м, в область пред- лопаточных лимфа- тических узлов	100	21
			300 + 0,05 % са- понины	14
			600	14
			600	14
1	Кролики, 3 голо-вы	п/к, в область под- коленных лимфати- ческих узлов	60	14
			120 + Монтанид	14
			120 + Монтанид	10
Получение анти-сывороток про-тив белка M1 ВГЛ				
2	Коза	п/к, в область под- коленных лимфати- ческих узлов	75	14
			150	14
			300 + 0,05 % са- понины	14
			230	14

Примечания: п/к – подкожно, в/м – внутримышечно, НАФ – неполный адьювант Фрейнда.

Таблица 3.

**Оценка активности и специфичности антисывороток,
полученных к типоспецифическим белкам ВГЛ
и выделенных из них гамма-глобулинов в РДП и ИФА**

Наименование антисыворотки	Схема гипер- иммунизции	Активность в РДП			Активность в ИФА	
		АгН	АгС ГЛ	АгС АЧЛ	сыворотки	IgG
Кроличьи	1	-	1/4	-	1/20480	1/40960
Козья	1	-	1/8	-	1/20480	1/20480
Козья	2	-	1/8	-	1/20480	1/20480

Примечания: «-» – отрицательный результат; АгН – антиген нормальный, культуральный; АгС ГЛ – антиген специфический гриппа лошадей; АгС АЧЛ – антиген специфический африканской чумы лошадей.

и в ИФА 1 : 20480. Иммуноглобулины, выделенные из этих антисывороток, показали сравнимую активность в ИФА.

Таким образом, антисыворотки, полученные к внутренним белкам (М и NP) ВГЛ, в дальнейшем могут быть использованы при разработке отечественных диагностических тест-систем, пригодных для обнаружения типоспецифического антигена А ВГЛ.

Заключение

1. В результате проведенных исследований были подобраны оптимальные способы очистки и концентрирования ВГЛ и выделения типоспецифических (NP и М1) белков из очищенных препаратов вируса.

2. С применением этих препаратов разработаны оптимальные схемы получения активных и специфичных антисывороток против данных штаммов вируса гриппа лошадей и его внутренних белков. Приготовленные антисыворотки пригодны для разработки и производства отечественных диагностических тест-систем с целью обнаружения типоспецифического антигена А и идентификации выделенных изолятов вируса гриппа лошадей.

Список литературы

1. Гусаков, В. В. Совершенствование лабораторной диагностики гриппа лошадей в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) / В. В. Гусаков // Автореферат диссертации. – Киев, 2000 год.
2. Домрачева, З. З. Вспышка гриппа А2 среди людей и лошадей / З. З. Домрачева // Микробиол., эпидемиол. и иммунол. – 1961. – С. 7–31.
3. Иванова, В. Т. Сравнительная характеристика биофизических свойств белков вирусов гриппа А,

В и С / В. Т. Иванова, Е. А. Говоркова, Л. Я. Закстельская // Вопр. вирусол. – 1984. – Т. 29. – № 3. – С. 276–281.

4. Иванова, В. Т. Сравнительное изучение электрофоретической подвижности полипептидов вирусов гриппа рода А / В. Т. Иванова, В. А. Исаченко, Л. Я. Закстельская, В. М. Жданов // Вопр. вирусол. – 1979. – № 5. – С. 505–510.

5. Иванова, Г. А. Грипп лошадей / Г. А. Иванова, М. В. Лихачев // Ветеринария. – 1970. – № 8. – С. 41.

6. Кыдырбаев, Ж. К. Сравнительная оценка параметров культивирования штаммов А/домашний гусь/Павлодар/1/05 (H5N1) и А/крачка/Южная Африка/61 (H5N3) вируса гриппа птиц на куриных эмбрионах / Ж. К. Кыдырбаев, К. К. Табынов, Ш. Ж. Рыскельдина, С. М. Мамадалиев // Матер. II Откр. Всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых // Ульяновская гос. сельскохозяйств. акад. – 2007. – С. 78–83.

7. Литвинова, О. М. Этиологический надзор в России на базе Федерального центра по гриппу / О. М. Литвинова, Л. Г. Юхнова, Н. И. Коновалова и др. // Тезисы науч. конф. «Грипп – XXI век», 28 сент. – 2 окт. 1997 г. С.-Петербург, Россия. – 1997. – 34 с.

8. Петров, Р. В. Получение гипериммунных сывороток к белку М вируса гриппа / Р. В. Петров, Р. М. Хаитов // Вопр. вирусол. – 1984. – № 3. – 271 с.

9. Слепушкин, А. Н. Эпидемиологические особенности гриппа последних лет / А. Н. Слепушкин, Д. К. Львов, И. Г. Маринич и др. // Вопр. вирусологии. – 1998. – № 2.

10. Старов, С. К. Справка по методам диагностики высокопатогенного вируса гриппа птиц / С. К. Старов // БИО. – Август 2006. – С. 13–15.

11. Lowry, O. H. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent / O. H. Lowry, N. I. Rosebrough, A. L. Farr et al. // J. biol. Chem. – 1951. – v. 193. – P. 265–275.

12. OIE, Manual of Standards for Diagnostics Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). – Vol. 1–2. – 5th ed. – Paris, 2004.

13. Zhirnov, O. P. Solubilization of matrix protein M1/M from virions occurs at different pH for orthomyxo- and paramyxoviruses / O. P. Zhirnov et.al. // Virology. – 1990 May. – 176 (1) : 274–9.

УДК 619:616.981.51(571)

Ключевые слова: сибирская язва, трупы, эпизоотии, областной ветеринарный врач, вакцинации, предохранительные прививки, уровень вакцинации

Key words: anthrax, corpses, epizootics, regional veterinarian, vaccinations, preventive vaccination, the level of vaccination

Дягилев Г. Т., Неустроев М. П.

**ИСТОРИЯ ОРГАНИЗАЦИИ ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ
И ПРОТИВОЭПИЗООТИЧЕСКИХ МЕРОПРИЯТИЙ ПРОТИВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ
НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)**
*THE HISTORY OF THE ORGANIZATION OF PREVENTIVE AND ANTI-EPIZOOTIC
MEASURES AGAINST ANTHRAX IN THE REPUBLIC OF SAKHA (YAKUTIA)*

ГНУ «Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Россельхозакадемии»

Адрес: 677001, г. Якутск, ул. Бестужева-Марлинского, 23/1

The Yakut Scientific Research Institute of Agriculture of the Russian Academy of Agricultural Sciences

Address: 677001, Russia, Yakutsk, Bestuzhev-Marlinsky street, 23/1

Дягилев Григорий Тимофеевич, к. в. н., зав. лабораторией технологии
и организации оленеводства. Тел. (4112) 21-45-74

*Dyagilev Gregory T., Ph. D., Head of the Laboratory of Technology and Reindeer
Breeding Management. Tel. +7 (4112) 21-45-74*

Неустроев Михаил Петрович, д. в. н., проф., директор института. Тел. (4112) 21-45-76

Neustroev Mikhail P., Doctor of Veterinary Medicine, Professor, Director of the Institute. Tel. +7 (4112) 21-45-76

Аннотация. В данной статье изложены первые ограничительные мероприятия против эпизоотий сибирской язвы на территории Якутской области, а также отражены вакцинопрофилактические мероприятия с 1897 по 2010 год. При этом определены количество вакцинированных животных, количество ветеринарных специалистов, а также уровень вакцинации против эпизоотий сибирской язвы по годам.

Summary The article describes the first restrictive measures against epizootic of anthrax in the Yakutsk region as well as vaccine preventive measures undertaken from 1897 to 2010. In addition, the number of vaccinated animals, the number of veterinary specialists and the level of vaccination against anthrax epizootics over the years are determined.

На территории, занимаемой Республикой Саха (Якутия) с площадью 3103,3 тыс. кв. км, сибирская язва стала регистрироваться по официальной статистике с 1811 года [3] и до середины девяностых годов XX столетия имела значительное распространение среди диких животных (олени, лоси, медведи).

Анализ накопленной информации по учету сибирской язвы свидетельствует о распространении данного заболевания практически во всех административных районах с охватом многих населенных пунктов республики, а возбудитель болезни выделен от всех видов традиционно разводимых здесь сельскохозяйственных животных (крупный рогатый скот, лошади и северные олени). Такое повсеместное проявление сибиреязвенной инфекции объясняется тем, что в дореволюционной Якутии существовали все условия для широкого распространения сибирской язвы на территории области, так как скот

тысячами погибал от бескормицы и эпизоотий прямо на пастбищах, а трупы оставались на поверхности земли, растаскивались собаками, хищными животными и птицами. Местное население, в прошлом отсталое и неграмотное, смотрело на гибель скота как на неизбежное зло и не применяло никаких мер борьбы с эпизоотиями, за исключением изоляции больных животных.

Громадные тундровые пространства на севере, большое количество лесных и болотистых местностей, недостаточность естественных водоемов с приточной водой – эти природные условия в сочетании с неудовлетворительным санитарным состоянием населенных пунктов способствовали не только развитию инфекции, но и дальнейшему стойкому консервированию сибиреязвенных бактерий.

В борьбе с эпизоотией сибирской язвы у властей и населения был один способ –

уборка трупов животных. В зимнее время трупы вовсе не зарывались по причине мерзлости почвы и не сжигались. При этом зарывание трупов признавалось населением предпочтительнее сжигания благодаря укоренившемуся убеждению о возможности распространения заразы через дым. Неграмотность населения о эпизоотии инфекционных заболеваний состоял в том, что в округе не было ветеринарных специалистов, которые лечили бы сельскохозяйственный скот населения. Окружные полицейские власти даже не имели понятия, с какой эпизоотией имеют дело. В отдельных случаях из-за отсутствия ветеринарных специалистов лечение домашних животных проводили первые медицинские врачи.

Так, в 1859 году медицинскому врачу Бральянгову удалось, благодаря своевременно принятым мерам изоляции животных, ликвидировать в некоторых населенных пунктах сибирскую язву Верхоянского округа [2].

Первые ограничительные мероприятия против сибирской язвы в Якутской области стали применяться с 1871 года, когда по предложению ветеринарного врача В. Г. Гольмана Якутский областной совет постановил: «Проезд нарочных, почты и частных лиц из Колымска в Верхоянск и обратно, из Верхоянска к Среднеколымску с апреля месяца до заморозков в зиму 1871 года прекратить, выжигать местность, где была зараза, сжигать и зарывать трупы» [1].

Областной ветеринар В. Г. Гольман работал и разослал в округа «Правила по борьбе с сибирской язвой», где было строго предписано отделять здоровый скот от больных, не сдирать шкуру, не срезать с павшей лошади гриву и хвост, не забивать больной скот, трупы павших животных глубоко закапывать в землю.

Мероприятия, проводимые Гольманом против сибирской язвы животных, характеризуют его достаточно высокий для своего времени уровень специальных знаний как ветеринарного врача.

В 1893 году Министерством внутренних дел России было отменено ограничение на прививки вакцинами Ценковского и Райте. Ветеринарные врачи в разных губерниях

России стали проводить пробные прививки против сибирской язвы. В 1897 году областной ветеринарный врач С. Я. Дмитриев впервые проводил опыт профилактической вакцинации против сибирской язвы в наиболее пострадавшем от эпизоотии сибирской язвы 1896 года Чиректейском наслеге Дюпсунского улуса (ныне Усть-Алданский район), где вакциной Пастера было привито 9 коров и 20 лошадей. Весной 1899 года в том же Дюпсунском улусе было привито уже 1019 голов, а в Средне-Вилуйском улусе действовал 21 пункт для прививок животных, где были вакцинированы 151 лошадь и 539 голов крупного рогатого скота [1]. Областной ветеринарный врач С. Я. Дмитриев постоянно информировал губернатора области об эпизоотии сибирской язвы, о падеже домашних животных и просил создать запас дезинфекционных средств (кристаллической и неочищенной карболовой кислоты), которые всегда необходимы в каждом случае сибирской язвы. По указу губернатора окружные исправники и управляющие округов ежемесячно письменно давали сведения о состоянии эпизоотии в своих наслегеях областному ветеринарному врачу. С. Я. Дмитриев ежегодно составлял список желающих на прививки своих животных против сибирской язвы и на основании этих списков просил у губернатора финансовые средства для покупки вакцины и дезинфицирующих растворов.

В период работы С. Я. Дмитриева на должности областного ветеринара ветеринарная служба Якутии оформилась организационно, появились первые ветеринарные фельдшера, появилась первая ветеринарная лечебница, первая бойня, первый ветеринарно-санитарный надзор за транспортировкой и убоем скота, появились первые массовые профилактические мероприятия против разных заболеваний [2].

Более успешно стала проводиться борьба против сибирской язвы с появлением в области в качестве областного ветеринарного инспектора магистра ветеринарии Сергея Александровича Грюнера, который в 1908 году организовал в Якутске ветеринарно-бактериологическую лабораторию. С. А. Грюнеру были хорошо известны пере-

довые методы борьбы с заразными и незаразными заболеваниями. Он через Якутского губернатора опубликовал обращение к населению, в котором разъяснял опасность сибирской язвы для людей и животных, о большой стойкости возбудителя, о необходимости зарывания трупов павших животных или о сжигании их и т. д. [1].

В 1909 году С. А. Грюнер провел испытание комбинированного метода вакцинации на группе опытных северных оленей. Для этой цели им вводили подкожно в области шеи 5 мл противоантраксной сыворотки и с другой стороны шеи 0,3 мл II вакцины Ценковского. Олени хорошо переносили прививки, у них наблюдалась заметно выраженная реакция.

С 1910 года прививки против сибирской язвы приняли массовый характер потому, что за павший от прививок скот владельцам стали выплачивать денежное вознаграждение, а с другой стороны, прививки сами стали агитировать за себя своими положительными результатами, и население перестало их бояться [1].

С 1910 года в Якутской области стали проводить иммунизацию северных оленей против сибирской язвы (этой работой руководил ветеринарный врач А. Н. Охотский) [3].

Под руководством С. А. Грюнера в Якутской ветеринарно-бактериологической лаборатории с 1909 года стали готовить противоантраксную сыворотку и вакцину Ценковского, что сыграло значительную роль в борьбе с эпизоотиями сибирской язвы [2].

Динамика вакцинации домашних животных против эпизоотии сибирской язвы и уровень вакцинации за весь исследуемый период представлена в таблице. Ее данные свидетельствуют, что начиная с 1910 года малочисленные ветеринарные работники начали вакцинацию домашних животных в очагах эпизоотий сибирской язвы. Несмотря на ежегодно проводимую вакцинопрофилактику домашних животных, в условиях Якутской области все же наблюдались подъемы и спады эпизоотий сибирской язвы. С 1913 по 1930 год сибирская язва ежегодно проявлялась в виде эпизоотий в Якутском, Вилуйском, Олекминском и Колымском округах. Характерной особенностью данной болезни

является то обстоятельство, что при исследовании причины возникновения каждого отдельного случая эпизоотии выясняется, что в данном районе в течение нескольких десятков лет эпизоотия сибирской язвы проявлялась в виде отдельных заболеваний. С весны 1914 года было организовано проведение предохранительных прививок в тех районах, где регистрировалась эпизоотия сибирской язвы в 1913 году. 1915 год характеризуется тем, что сибирская язва проявляется главным образом на границах прежних неблагополучных районов. Крупные эпизоотии сибирской язвы с 1913 по 1915 год в Якутской области были приостановлены благодаря своевременно проведенным предохранительным прививкам [4].

В эти годы ветеринарные работники прививали от 30 000 до 75 000 домашних животных и уровень вакцинации составлял всего от 10,6 до 22 %.

Наиболее сложная эпизоотическая ситуация по сибирской язве животных в Якутии сложилась за период с 1916 по 1941 год.

С 1916 года ветеринарные работники, в силу каких-то неизвестных причин, стали оставлять службу в Якутии, и в 1917 году в ветеринарной службе находился один ветеринарный врач с пятью ветеринарными фельдшерами. В 1919 году на государственной службе не осталось ни одного ветеринарного врача, а из младшего ветеринарного персонала осталось четыре фельдшера. В 1916–1917 годах, несмотря на все трудности, единственный ветеринарный врач Александр Павлович Конусов с пятью ветеринарными фельдшерами, проводили предохранительные прививки против эпизоотии сибирской язвы с охватом от 16 000 до 39 517 голов [1].

В рассматриваемый период в Якутии повсеместно наблюдался падеж рогатого скота и лошадей от различных заболеваний. Из всех болезней скота особую опасность ежегодно представляла сибирская язва, периодически внезапно вспыхивавшая в различных районах Якутии. Распространение эпизоотии, а следовательно и падеж скота в разных районах были неодинаковыми. Неодинаковой была и степень тяжести бо-

лезни, которая колебалась в зависимости от времени года. Эпизоотия сибирской язвы особенно активизировалась в теплые летние месяцы. Зимой наступал период ее локализации, что объяснялось некоторым ограничением распространения болезни стойловым содержанием скота. Ежегодные вспышки эпизоотии сибирской язвы были связаны с наличием многочисленных стационарно неблагополучных пунктов, а малочисленность ветеринарных специалистов до 60-х годов прошлого столетия не предоставляла реальных возможностей провести полную вакцинопрофилактику против эпизоотии сибирской язвы на территории республики [5].

Суровые природно-климатические и тяжелые дорожно-транспортные условия создавали определенные трудности в обслуживании населения, разбросанного по огромной территории республики Якутии.

Деятельность небольшого коллектива ветперсонала выражалась в борьбе с эпизоотиями, лечебно-санитарной помощи, надзоре за убоем и движением гуртового и торгово-промышленного скота, осмотре сырых животных продуктов, участии в судебно-ветеринарной экспертизе и сборе ветеринарно-санитарного налога. Из таблицы видно, что с 1919 по 1930 год ежегодно в той или иной мере проводились прививки против сибирской язвы, а уровень вакцинации домашних животных составлял всего от 1,05 до 11,3 % животных [4]. Отсюда видно, что в эти годы вакцинация животных тоже не получала широкого распространения. Большую помощь в лечебной и профилактической работе оказывала Якутская ветеринарно-бактериологическая лаборатория, которая в основном занималась изготовлением вакцины против сибирской язвы. Несмотря на нехватку материала, посуды, даже пробок и резины с 1920 по 1924 год было приготовлено 62 тыс. см³ противосибирских вакцин [2]. Одним недостатком ветеринарной сети республики было то, что в этот период она распределялась главным образом в южных, более густонаселенных районах. Северные же районы республики оставались по-прежнему лишены квалифицированной ветеринарно-врачебной помощи. Начиная с

1931–1932 годов в республике начинается заметное увеличение количества ветеринарных специалистов по сравнению с первыми годами Советской власти. В результате в целях борьбы с эпизоотиями на севере начинают создавать подвижные отряды. Их задачей являлось оказание ветпомощи преимущественно кочующему населению [5]. На Севере, где естественно-климатические условия и условия содержания оленей исключают возможность применения ветеринарно-санитарных мероприятий, прививки являются главнейшей мерой в борьбе с сибирской язвой.

По-прежнему основой борьбы с эпизоотиями являлись профилактические прививки. Из таблицы видно, что начиная с 1931–1932 годов количество вакцинированных животных резко увеличиваются, а уровень вакцинации домашних животных увеличился до 77–86 %. Начиная с 1933 года крупные эпизоотии сибирской язвы на территории республики регистрировались всего три раза (1938, 1949, 1969 гг.), в остальных случаях регистрировались очаговые случаи эпизоотии, которые ветеринарные специалисты оперативно ликвидировали на местах. В 1938 году крупные эпизоотии сибирской язвы отмечались в Оймяконском, Момском, Томпонском районах, в 1949 году – в Жиганском районе, а в 1969 году эпизоотия сибирской язвы вспыхнула в Оленекском районе. Во всех вышеперечисленных районах эпизоотия сибирской язвы регистрировалась в оленеводческих хозяйствах [6].

Выводы

I. Сравнительно-историческое исследование проведенных лечебно-профилактических мероприятий против эпизоотии сибирской язвы на территории Якутии позволило нам выяснить:

- первые ограничительные мероприятия против сибирской язвы в Якутской области стали применяться с 1871 года первым ветеринарным врачом В. Г. Гольманом;
- первый опыт профилактической вакцинации против сибирской язвы у 9 коров и 20 лошадей проведено в 1897 году ветеринарным врачом С. Я. Дмитриевым;

Таблица.

Количество вакцинированных животных,
количество ветеринарных специалистов и уровень вакцинации по годам

1930	112454	12/27	11,3
1929	24825	12/22	3,08
1928	31049	12/22	3,67
1927	34784	6/11	4,39
1926	34424	6/11	4,85
1925	34784	5/10	6,32
1924	20000	2/12	3,8
1923	18562	1/11	4,0
1922	6726	2/9	1,06
1921	17538	1/9	2,37
1920	27412	1/6	3,43
1919	4251	0/4	1,05
1918	20425	1/5	5,76
1917	39517	1/6	5,40
1916	16000	6/5	4,46
1915	30418	6/6	10,6
1914	71000	7/5	19,7
1913	75000	6/5	21,9
1912	1082	8/7	0,31
1911	10038	7/7	2,8
1910	2504	6/7	0,53
1899	1709	1/0	0,39
1897	29	1/0	0,0058
Даты	Количество вакцинированных животных	Количество вет. специалистов (вр./фельд.)	Уровень вакцинации

2010	500145	1000/1400	78,5
2005	541485	1000/1409	90,5
2000	499444	1000/1500	81,7
1995	617834	1000/1800	66,7
1990	873689	1000/1800	80,2
1985	721700	717/419	77,1
1980	673264	277/174	86,1
1975	576400	240/124	75,4
1970	563,949	195/147	87,2
1965	574771	200/180	93,6
1960	212827	138/155	25,5
1955	179700	148/199	23,0
1950	138187	27/112	16,7
1945	85986	25/69	13,1
1940	179480	28/40	22,8
1939	182881	6/40	23,7
1938	134000	9/50	22,3
1937	162207	5/38	21,1
1936	109310	8/40	14,2
1935	143742	13/47	18,8
1934	94000	6/28	13,6
1933	122000	7/33	16,4
1932	210000	22/36	28,1
1931	183854	13/29	20,6
Даты	Количество вак- цинированных животных	Количество вет. специалистов (вр./фельд.)	Уровень вакцинации

- в 1908 году под руководством областного ветеринарного инспектора С. А. Грюнера начала работать ветеринарно-бактериологическая лаборатория в г. Якутске. С 1909 года в данной лаборатории начали готовить противостолбнячную сыворотку и вакцину Ценковского, которые сыграли большую роль в борьбе с эпизоотиями сибирской язвы;

- с 1910 года ветеринарные специалисты начали вакцинацию домашних животных в Якутской области с апреля месяца ежегодно;

- начиная с 1920 года ветеринарные специалисты ежегодно проводили вакцинацию домашних животных в неблагополучных пунктах по сибирской язве. Но из-за малочисленности ветеринарных специалистов, суровости природно-климатических условий, трудности дорожно-транспортных условий, недостаточностью вакцин уровень вакцинации домашних животных до 30-х годов составлял всего 10–11 %;

- начиная с 1932 года с заметным увеличением количества ветеринарных специалистов и с улучшением материально-технической базы ветеринарной сети уровень вакцинации домашних животных в 70–80-е годы достиг 75–87 %.

II. Но тем менее до 60-х годов укомплектованность ветеринарных специалистов составляла всего 60–63 %, то есть в 1960 году в ветеринарных учреждениях республики не хватало 87 ветеринарных врачей и 117 ветеринарных фельдшеров. В результате ветеринарные учреждения долго не могли добиться налаживания нормального ветеринарного обслуживания:

- анализируя официальные данные ветеринарной статистической отчетности по заболеванию сельскохозяйственных животных, а также по результатам исследования работы о вакцинопрофилактике против эпи-

зоотии сибирской язвы, приходим к следующему: крупные эпизоотии сибирской язвы с 1940 года на территории республики не регистрировались, за исключением двух случаев в 1949 и 1969 годах. Последние крупные эпизоотии сибирской язвы регистрировались в оленеводческих хозяйствах северных районов в результате необоснованного отказа руководителей оленеводческих хозяйств от вакцинации оленей;

- по результатам исследования в 1958, 1960–1968 (8 лет), 1971–1973 (3 года), 1975, 1978–1979 (1 год) и 1981–1985 (5 лет) годах на территории республики не регистрировались эпизоотии сибирской язвы;

- основными причинами возникновения спорадических случаев сибирской язвы на территории республики являются природная очаговость болезни и неполный охват прививками против сибирской язвы домашних животных;

- последний случай эпизоотии сибирской язвы на территории республики регистрировался в 1993 году в Мирнинском районе.

Список литературы

1. Огнев, Н. И. Особенности эпизоотологии сибирской язвы в Якутии и Западной Сибири в связи с солнечной активностью (по материалам архивов Сибири) / Н. И. Огнев // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 1977. – № 5. – С. 74–80.
2. Огнев, Н. И. Ветеринарная служба в Якутии с 1853 по 1919 гг. / Н. И. Огнев // Ученые записки Якутского государственного университета. – Якутск, 1962. – Вып. 13. – С. 87–97.
3. Чернявский, В. Ф. Основные зооантропонозы в Якутии (эпизоотология и эпидемиология) / В. Ф. Чернявский, В. С. Карпов, Т. Д. Каратаева. – Якутск, 1997. – С. 27–65.
4. ЯЦГА, Фонд 55, опись 15, дело 444, лист 104–109.
5. ЯЦГА, Фонд 55, опись 27, дело 80, лист 706–707.
6. ЯЦГА, Фонд 55, опись 27, дело 13, лист 1–9.



**Проконсультируйтесь по УЗИ- и (или) рентгенодиагностике
на специальных ветках ФОРУМА:
www.ivb.forum24.ru**

УДК 619:616.988.21(47+51)

Ключевые слова: бешенство, лисы, собаки, кошки, диагностика

Key words: rabies, foxes, dogs, cats, diagnosis

Кудряшов А. А., Яшина В. Г.

СЛУЧАИ БЕШЕНСТВА ДИКИХ И ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ В ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ В 1989 ГОДУ

THE CASES OF RABIES IN WILD AND DOMESTIC ANIMALS IN LENINGRAD REGION IN 1989

¹ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»

Адрес: 196084, Санкт-Петербург, Черниговская ул., д. 5. Тел. (812) 388-13-78

¹*Saint-Petersburg State Academy of Veterinary Medicine*

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

²Управление ветеринарии Санкт-Петербурга

Адрес: 191036, Санкт-Петербург, 4-я Советская ул., 5. Тел. (812) 271-14-20

²*Saint-Petersburg Veterinary Department*

Address: 191036, Russia, Saint-Petersburg, 4-th Sovetskaya street, 5. Tel. +7 (812) 271-14-20

Кудряшов Анатолий Алексеевич, д. в. н., проф., зав. каф. патологической анатомии¹*Kudryashov Anatoliy A., Doctor of Veterinary Medicine, Professor, Head of the Pathologic Anatomy Dept.¹*

Яшина Валерия Геннадьевна, нач. отдела организации и контроля

противоэпизоотических и профилактических мероприятий²*Yashina Valeria G., Head of the Dept. of Management and Control Over the Anti-Epizootic and Preventive Measures²***Аннотация.** Дана информация о 16 случаях заболевания бешенством лис, собак, кошек, а также человека, имевших место в Ленинградской области в 1989 году.**Summary.** The article describes 16 cases of rabies in foxes, dogs, cats and a man which took place in Leningrad region in 1989.

Введение

Бешенство было и остается одним из наиболее актуальных зооантропонозов в России [2]. В настоящее время диагностике, профилактике и ликвидации этой особо опасной болезни уделяется большое внимание со стороны федеральных и региональных ветеринарных органов.

С этих позиций видится целесообразным познакомить читателей журнала со случаями заболевания диких и домашних животных бешенством, некоторыми мероприятиями по диагностике и ликвидации бешенства во время вспышки болезни среди диких и домашних животных в Ленинградской области в 1988–1989 гг.

Авторы статьи были непосредственными исполнителями работы по диагностике бешенства, работая в те годы в Ленинградской городской ветеринарной лаборатории (ЛГВЛ, директор лаборатории – Груздева Е. К.): Кудряшов А. А. – в качестве зав. патологоанатомическим отделом, Яшина В. Г. – ветери-

нарного врача бактериологического отдела (зав. отделом – Балашова Л. М.), в котором в то время наряду с бактериологическими проводились и вирусологические исследования.

Для подготовки статьи использованы данные журналов лабораторных исследований 1988–1989 годов. При изложении материала авторы сообщают об обстоятельствах ряда случаев бешенства, о фактах, которые ранее не были опубликованы.

Хроника событий

Знаменательно, что описываемым событиям предшествовал случай бешенства у собаки, с которым мы столкнулись годом ранее. В какой-то мере он подготовил отделы лаборатории к предстоящей работе в плане ответственности и объективной сложности исследований.

Зимой 1988 года у жителя Ленинграда, охотившегося на лис в Псковской области, заболела и пала собака, фокстерьер, 7 лет, добывавшая лис в норах. Охотник привез труп

собаки в Ленинград, в патологоанатомическом отделе ЛГВЛ собака была вскрыта. При вскрытии найдены единичные крупноточечные кровоизлияния в слизистой оболочке пилорического отдела желудка, что в совокупности с отсутствием других патологоанатомических изменений считается достаточно типичным явлением при бешенстве [1, 4].

Отобранный головной мозг исследовали на бешенство в бактериологическом отделе. Проведенный нормативный комплекс исследований (МФА, реакция преципитации, биологическая проба) не выявил вирус в патологическом материале.

Поскольку имелся настораживающий анамнез (смерть собаки, контактировавшей с лисами, неблагополучие по бешенству района охоты в Псковской области), а также подходящие патологоанатомические изменения, было предпринято повторное исследование, в результате которого при биологической пробе удалось выявить вирус в головном мозге у одной мыши.

В начале декабря 1988 г. Кудряшов А. А. был откомандирован Городским ветеринарным отделом (зав. отделом – Романов А. Н., ст. ветврач-эпизоотолог – Денисова Н. Ф.) в состав комиссии из медицинских и ветеринарных специалистов в связи со случаем заболевания военнослужащего бешенством. Комиссия выясняла суть этого чрезвычайного происшествия.

На полигоне одного из военных училищ во время занятий курсантов строевой и боевой подготовкой появилась лиса с необычным поведением. Она не боялась людей, не пыталась убежать. После ухода курсантов, по окончании занятий, лису приютили солдаты срочной службы, дислоцированные на полигоне, поместив ее на привязи в подсобном помещении. На 2–3 день лиса вцепилась зубами в руку одному из солдат. Он, дабы освободиться от лисы, убил ее ударом твердого предмета. Убитую лису выбросили в кустарник на территории полигона. По поводу укушенной раны солдату дважды оказали медицинскую помощь при амбулаторном приеме в войсковой части, но по трагическому недоразумению пострадавший не получил антирабического лечения. При-

мерно через 3–4 недели он тяжело заболел. С учетом анамнеза и клинического проявления медики поставили диагноз «бешенство». Во время работы комиссии удалось разыскать труп убитой лисы. При вирусологическом исследовании в головном мозге этой лисы выявили вирус бешенства.

Экстренно было созвано заседание чрезвычайной противоэпизоотической комиссии Ленинградских областного и городского исполкомов. Комиссия приняла ряд решений по мероприятиям для ликвидации бешенства.

В частности, было решено все трупы животных, подозрительных в заболевании бешенством, исследовать в Ленинградской городской ветеринарной лаборатории. Основным аргумент в пользу этого решения – расположение патологоанатомического отдела, в котором проводили вскрытие и отбор патологического материала для вирусологического исследования, на Ленинградском заводе по производству мясокостной муки (в просторечии – «Утильзаводе») по адресу: Ташкентская улица, 13. На этом закрытом предприятии имелись условия и опыт по обезвреживанию трупов (и других биологических отходов) и предупреждению распространения заразных болезней.

Так как патологоанатомический отдел являлся подразделением Городской ветеринарной лаборатории, то вирусологические исследования проводились в соответствующем отделе этой лаборатории. С этой целью в декабре 1988 г. – марте 1989 г. было доставлено и исследовано более 200 трупов диких и домашних животных, заподозренных в заболевании бешенством. Большую работу по выполнению главной задачи – ликвидации бешенства, в частности по выявлению больных и подозрительных в заболевании животных, по вакцинации и другим мероприятиям, предстояло провести и было проведено ветеринарными специалистами совхозов и государственной ветеринарной службы Ленинградской области, возглавляемой Шутовым Э. Е. Предвосхищая конец событий, сразу отметим, что эта задача была успешно решена по сути за несколько недель. С начала марта 1989 г. ни одного случая болезни уже не было зарегистрировано.

Тем временем в патологоанатомический отдел ежедневно поступали трупы павших и убитых животных, подпадавших под категорию подозрительных по бешенству. Особенное внимание уделялось диким животным. Именно у нескольких лис было диагностировано бешенство в начале вспышки.

Несколько эпизодов из описываемых событий.

Источником возбудителя при этой вспышке оказались лисы. Наряду с вышеописанным случаем с лисой на военном полигоне, примечательны данные о заболевании лис в окрестностях д. Сойкино Ломоносовского района, где, по рассказам жителей и анамнестическим данным в направлениях ветеринарных специалистов, лисы, не опасаясь ни людей, ни собак, бегали по деревне, вступали в драки с собаками. В течение декабря 1988 г. – января 1989 г. при патологоанатомическом и вирусологическом исследованиях у 1 собаки и 7 лис из Ломоносовского района (в т. ч. д. Сойкино) было диагностировано бешенство.

Учитывая особую опасность болезни, по решению руководства города и области газета «Ленинградская правда» (ныне именуемая «Санкт-Петербургские ведомости») опубликовала большую статью, информировавшую читателей о бешенстве, о трагической гибели человека и о необходимых действиях населения при подозрении на бешенство у животных. Бесспорно, эта мера была своевременна и очень полезна, так как помогла предотвратить заболевание и смерть многих людей. В статье предписывалось при малейшем подозрении, а особенно при укусе животным, немедленно обращаться в антирабический пункт, другие медучреждения, а трупы павших животных доставлять для исследования в патологоанатомический отдел. Как подтверждение необходимости и своевременности статьи – несколько случаев, среди которых фигурируют уже и домашние животные.

Один из них связан с двумя лисами, которых, по рассказу пострадавшего мужчины-охотника, он добыл, «взяв голыми руками». Лисы не убежали от охотника, позволили себя поймать. Мужчина поранил руки при

съемке кож, а прочитанная статья заставила его сдать лис на исследование. У обеих был выявлен вирус бешенства.

Другой случай связан с котом, покусавшим руки своих хозяек – матери и дочери, жителей одного из селений Гатчинского района. Кот вскоре умер, и опять же газетная статья привела покусанных женщин в лабораторию. У кота было установлено бешенство. Известно, что в мероприятия по борьбе с бешенством входит умерщвление животных, находившихся в контакте с бешеным животным. Во исполнение инструкции были подвергнуты эвтаназии 3 других животных из дома пострадавших: 1 кошка и 2 собаки. После вскрытия и вирусологического исследования у кошки и 1 собаки также установлено бешенство.

Памятны еще два случая.

Первый случай: бешенство у кошки в д. Б. Колпаны, где главный ветеринарный врач совхоза «Гатчинский» Андреев Ю. А. заподозрил бешенство по клиническим признакам. Кошка была изолирована и вскоре пала; в лаборатории в результате вскрытия и вирусологического исследования клинический диагноз подтвердили.

Второй случай: в п. Тайцы сотрудник милиции застрелил собаку, бегущую вдоль шоссе и покусавшую несколько человек. Таким образом, широкая огласка населения и милиции позволили реагировать на подозрительное поведение животных.

В общей сложности за период с начала декабря до конца марта в патологоанатомический отдел доставлено более 200 трупов животных различных видов, включая лис, волков, барсуков, собак, кошек, крупного рогатого скота и других. Для выявления заражения диких животных отстрелено и исследовано несколько десятков волков и лис из ряда районов Ленинградской области.

Из всех исследованных животных бешенство установлено у 16 особей: у 10 лис, 3 собак и 3 кошек. Нельзя не отметить, что у 11 из 16 бешеных животных на вскрытии обнаружены мелко- и крупноточечные кровоизлияния в слизистой оболочке желудка, главным образом, в пилорическом и донном отделах. Какие-либо другие патологоанато-

мические изменения не были установлены. Это согласуется с мнением отечественных ученых, имевших большой опыт в диагностике бешенства, об относительно высокой специфичности данного признака [3].

Помимо трагического случая с военнотружущим, заболевание людей бешенством больше не произошло.

Научные эпизоотологические исследования описываемой вспышки бешенства, по нашей информации, не проводились. Поэтому, вероятно, будет уместным высказать свое суждение по возникновению бешенства у южных окраин Ленинграда. Скорее всего, возбудитель бешенства распространился среди лис из прилегающих к Ленинградской области регионов – из Псковской области (или Эстонии). Распространению могло способствовать увеличение численности лис и наличие большого лесного массива в районе г. Сосновый Бор, где располагалась обширная закрытая зона по причине близости ЛАЭС.

Также в 1989 году (летом) в ЛГВЛ диагностировали бешенство у енотовидной собаки, доставленной из Выборгского района Ленинградской области, граничащего с Финляндией и прилегающего к Ленинграду с севера. Показательно, что в это же время регистрировалось бешенство у енотовидных собак в Финляндии, о чем проинформировали финские специалисты участников совместного семинара, состоявшегося в 1989 году в Ленинграде, в Городском ветеринарном отделе.

Выводы

При вспышке бешенства, случившейся в Ленинградской области в 1988–1989 гг., основным фактором в распространении возбудителя явились лисы.

Наиболее характерными клиническими признаками у больных лис отмечены отсутствие пугливости и, в меньшей степени, агрессивность.

У большинства бешеных животных на вскрытии найдены кровоизлияния в слизистую оболочку желудка, при этом отсутствовали какие-либо иные патологоанатомические изменения.

Заключение

Описываемые события дают некоторое представление о совместной работе ветеринарных служб Ленинградской области и Ленинграда (в частности ЛГВЛ), силами которых в короткий срок была ликвидирована вспышка бешенства в пригородных районах Ленинградской области и предотвращено распространение болезни в Ленинград. Это лишний раз подтверждает постулат о необходимости единства руководства и действий всех служб и сил при чрезвычайных ситуациях, каковыми являются особо опасные болезни.

Список литературы

1. Мари, Н. Н. Основы патологической анатомии домашних животных / Н. Н. Мари. – СПб. : Практическая Ветеринария, Ф. В. Эттингер, 1913. – С. 193–218.
2. Сухарьков, А. Ю. Перспективы использования иммуноферментного анализа для оценки эффективности антирабической вакцинации животных / А. Ю. Сухарьков, Е. В. Чернышова, Н. А. Назаров // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2012, 2 (14). – С. 34–40.
3. Черняк, В. З. Патологоанатомическая диагностика инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных / В. З. Черняк. – М., Л. : Сельхозгиз, 1957. – С. 231–233.
4. Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Fifth edition : edited by M. Grant Maxie. – Elsevier Saunder, 2007. – P. 411–416.



**Подпишись на рассылку новостей
Института Ветеринарной Биологии для специалистов,
чтобы первым узнать о новых учебных программах,
методических разработках в области диагностики и лечения
мелких домашних животных:
www.invetbio.spb.ru/subscribe.htm**

УДК 619:615.371

Ключевые слова: реассортантный холодоадаптированный штамм, грипп лошадей, безвредность, иммуногенность
 Key words: reassortant cold-adapted strain, equine influenza, safety, immunogenicity

Табынов К. К., Кыдырбаев Ж. К., Сансызбай А. Р., Рыскельдинова Ш. Ж.,
 Асанжанова Н. Н., Кожамкулов Е. М., Инкарбеков Д. А.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ БЕЗВРЕДНОСТИ
 И ИММУНОГЕННОСТИ ХОЛОДОАДАПТИРОВАННОГО РЕАССОРТАНТНОГО
 ШТАММА А/НК/ОТАР/6:2/2010 ВИРУСА ГРИППА НА ЛОШАДЯХ**
*EXPERIMENTAL STUDY OF THE SAFETY AND IMMUNOGENICITY OF COLD-ADAPTED
 REASSORTANT STRAIN A/HK/OTAR/6:2/2010 OF INFLUENZA VIRUS IN HORSES*

РГП Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности (НИИПББ) КН МОН РК
 Адрес: 080409, Республика Казахстан, Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский
RGE Research Institute for Biological Safety Problems (RIBSP) SC ME&S RK
Address: 080409, Republic of Kazakhstan, Zhambylskaya oblast, Kordaiskiy region, pgt. Gvardeiskiy

Табынов Кайсар Казыбаевич, к. в. н., зав. лабораторией / *Tabynov Kaissar K., Ph.D., Laboratory Chief*
 Кыдырбаев Жайлаубай, к. в. н., доцент, вед. научн. сотрудник
Kydyrbayev Zhailaubai, Ph.D., Associate Professor, Leading Researcher
 Сансызбай Абылай Рысбайулы, д. в. н., проф., академик КАСХН, ген. директор
Sansyzbay Abylai R., Doctor of Veterinary Medicine, Professor, Academician
of the Kazakhstan Academy of Agricultural Sciences, General Director

Рыскельдинова Шолпан Жанбырбаевна, ст. научн. сотрудник / *Ryskeldinova Sholpan Zh., Senior Researcher*
 Асанжанова Нурика Нарынбековна, к. м. н., ст. научн. сотрудник / *Assanzhanova Nurika N., Ph.D., Senior Researcher*
 Кожамкулов Еркен Муратханович, научн. сотрудник / *Kozhamkulov Yerken M., Researcher*
 Инкарбеков Дулат Амангельдиевич, мл. научн. сотрудник / *Inkarbekov Dulat A., Junior Researcher*

Аннотация. В настоящей работе представлены результаты экспериментального изучения безвредности и иммуногенности реассортантного холодоадаптированного штамма А/НК/Отар/6:2/2010 вируса гриппа, полученного методом классической генетики из штаммов: донора аттенуации А/Гонконг/1/68/162/35 (H3N2) и эпизоотически актуального вируса А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8). Установлено, что реассортантный вирус безвреден и иммуногенен для жеребят годовалого возраста при интраназальном инфицировании в дозе $2 \times 8,0 \lg \text{EID}_{50}/\text{животное}$ (по 1 мл в каждую ноздрю). Жеребята, привитые реассортантным холодоадаптированным штаммом А/НК/Отар/6:2/2010, при контрольном заражении эпизоотическим штаммом А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) вируса гриппа лошадей интраназальным способом в дозе $8,0 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$ (в каждую ноздрю) в 100 % случаев проявляли устойчивость к гриппозной инфекции и не выделяли вирус в окружающую среду.

Summary. The given paper presents results of experimental study of the safety and immunogenicity of influenza virus's reassortant cold-adapted strain A/NK/Otar/6:2/2010, obtained by the method of classical genetics of strains: attenuation donor A/Hong Kong/1/68/162/35(H3N2) and epizootic actual virus A/horse/Otar/764/07(H3N8). It was established, that reassortant virus is safety and immunogenic for foals one year of age in intranasal infection in a dose of $2 \times 8,0 \lg \text{EID}_{50}/\text{animal}$ (1 ml in each nostril). Foals, vaccinated with reassortant cold-adapted strain A/NK/Otar/6:2/2010, after reference intranasally infection with equine influenza virus's epizootic strain A/horse/Otar/764/07(H3N8) in a dose of $8.0 \lg \text{EID}_{50}/\text{ml}$ (in each nostril) showed resistance to influenza infection and didn't excrete a virus in the environment.

Введение

Вирус гриппа лошадей (ВГЛ) является ведущей причиной болезней органов дыхания у лошадей. Различают два субтипа ВГЛ: субтип 1 – H7N7 и субтип 2 – H3N8. Несмотря на то, что ВГЛ субтипа H7N7 в последние годы не регистрируется, ВГЛ субтипа H3N8 на сегодня является серьезной угрозой здоровью лошадей и экономической проблемой для всего коневодства [1].

Основным звеном в системе противоэпизоотических мер при гриппе лошадей является специфическая профилактика инфекции. При этом стратегия вакцинации в настоящее время сводится к применению инактивированных и живых вакцин.

Начиная с 1960-х годов, после ряда успешных полевых испытаний в ветеринарную практику были широко внедрены инактивированные вакцины, содержащие целые

вирусные частицы или их субъединицы. Главные преимущества этих вакцин заключаются в безвредности, отсутствии вирусной репликации и возможности распространения вируса среди поголовья привитых лошадей. Основными недостатками инактивированных вакцин являются их слабая иммуногенность, обусловленная формированием исключительно гуморального иммунитета, а также непродолжительный иммунитет, нуждающийся в многократном введении препарата [7]. Некоторые инактивированные вакцины с масляными адъювантами к тому же обладают высокой реактогенностью у привитых животных, вызывая воспалительные реакции на месте введения препарата [10].

Указанные недостатки инактивированных вакцин побудили многих исследователей приступить к поиску наиболее эффективных вакцинных препаратов против этой опасной инфекции. Исследованиями Hannant D. et al. [4] показано, что иммунный ответ, вызванный экспериментальной инфекцией с вирусом гриппа, сохраняется и защищает лошадей от заболевания в течение одного года. Авторами отмечено, что вакцины, имитирующие инфекционный процесс, являются более эффективными по сравнению с инактивированными препаратами. И по этой причине за последние 20 лет разработка живых аттенуированных и векторных вакцин являлась главным подходом в создании эффективных препаратов против гриппа лошадей.

Среди разработанных живых аттенуированных вакцин особое место занимают препараты, приготовленные на основе холодоадаптированных штаммов. В естественных условиях холодоадаптированные (Ts) штаммы вируса гриппа лошадей эффективно репродуцируются в верхних дыхательных путях, где они вызывают местные и системные иммунные ответы. Наиболее значимое преимущество этого штамма заключается в том, что он неспособен размножаться при высоких температурах нижних дыхательных путей, где репликация дикого вируса обычно сопровождается развитием бронхита, пневмонии и отека легких [5].

Описанный подход в создании живой вакцины против гриппа лошадей из холодоадаптированного штамма с успехом применен в странах Северной Америки. С 1999 года в Северной Америке лицензирована и широко применяется живая холодоадаптированная модифицированная вакцина (Flu Avert™ I.N., Intervet), вводимая интраназально. В своем составе вакцина содержит штамм Кентукки/91 H3N8 североамериканского происхождения, но вакцина также может вызывать защиту от европейского штамма H3N8. Несмотря на то, что вакцина Flu Avert™ I.N. не стимулирует высокий уровень гуморального ответа, однократное введение этой вакцины вызывает более продолжительную защиту от инфекции (12 месяцев), чем инактивированные вакцины. Наиболее значимым преимуществом этой вакцины является то, что она формирует иммунный ответ, сходный с таковым при естественной инфекции [3, 9].

В Казахстане, также как и в странах Северной Америки, для специфической профилактики гриппа лошадей в рамках Научно-технической программы «Грипп лошадей: эпизоотологический мониторинг, разработка средств специфической профилактики и диагностики» на 2010–2012 годы разрабатывается живая вакцина на основе реассортантного холодоадаптированного штамма А/НК/Отар/6:2/2010 со структурой генома 6 : 2 (6 генов от донора и 2 гена от актуального вируса), полученного методом классической генетики из штаммов: донора аттенуации А/Гонконг/1/68/162/35 (H3N2) и эпизоотически актуального вируса А/лошадь/Отар/764/07(H3N8). Исходя из этого, целью настоящих исследований было экспериментальное подтверждение безвредности и иммуногенности полученного в НИИПББ реассортантного холодоадаптированного штамма А/НК/Отар/6:2/2010 на лошадях.

Материалы и методы

Определение безвредности вируса

Для определения безвредности лошадям (n=4) годовалого возраста и серонегативных к вирусу гриппа субтипа H3 (титр антител в РТГА ниже чем 1:16) интраназально

с помощью шприца-распылителя вводили аллантоисную вируссодержащую суспензию штамма А/НК/Отар/6:2/2010 в дозе $2 \times 8,0 \text{ lg ЭИД}_{50}$ /животное (по 1 мл в каждую ноздрю). Лошадям из группы негативного контроля (n=4) аналогичным образом вводили стерильный физиологический раствор.

Наблюдение за общим клиническим состоянием животных опытной и контрольной групп вели в течение 4 недель. При этом клиническое состояние здоровья животных оценивали по бальной системе по следующим параметрам.

Общее состояние: общее состояние в норме (0); недуг / депрессия / нормальный аппетит (1); недуг / депрессия / понижение аппетита (2); обезвоживание (2); истощение (4); неспособность стоять (30); на грани смерти (50) и гибель (100).

Наблюдение за дыханием: учащенное дыхание (2); одышка (4); кашель: 2–5 раз в 10 минут (1); 6–20 раз в 10 минут (2); больше чем 20 раз в 10 минут (3).

Наблюдение за состоянием глаз: слезотечение (1); умеренное слизисто-гнойное выделение (2); сильное слизисто-гнойное выделение (4); умеренный конъюнктивит (2); сильный конъюнктивит (4).

Наблюдение за состоянием носа: выделение серозной слизи из носа (1); умеренное слизисто-гнойное выделение из носа (2); сильное слизисто-гнойное выделение из носа (4); чихание 2–5 раз в 10 минут (1); 6–20 раз в 10 минут (2); больше чем 20 раз в 10 минут (3).

Ректальная температура: диапазон температуры между 38,5 и 39,0 °C (1); между 39,1 и 39,5 °C (2) и между 39,6 и 40,0 °C (3).

Ввиду того, что испытуемый штамм вируса будет использован для разработки живой вакцины, провели исследования по определению степени выделения вируса у инфицированных животных в окружающую среду через верхние дыхательные пути. Для этого у лошадей опытной и контрольной групп на 3, 7, 14 сутки после введения вакцины и физиологического раствора, соответственно, брали пробы носоглоточных смывов в пробирки с 1 мл транспортной вирусной среды (стерильный раствор телячьего инфу-

зионного бульона, фракция V бычьего альбумина, гентамицина сульфата и нистатина). Отобранные смывы закладывали на низкотемпературное хранение при минус 70 °C для последующего титрования на 10-суточных куриных эмбрионах. Специфичность вируса, выделенного из носоглоточных смывов, определяли с помощью коммерческой экспресс тест-системы Directigen Flu A (Becton-Dickinson, США).

Определение иммуногенности и протективности вируса

Для определения иммуногенности и протективности штамма А/НК/Отар/6:2/2010 у лошадей (опытная и контрольная группы), находящихся в опыте по оценке безвредности, на 7, 14 и 28 сутки после инфицирования (п. и.) брали образцы крови для определения уровня накопления сывороточных антител в РТГА. РТГА ставили по общепринятой методике с использованием 1%-й взвеси эритроцитов петуха.

На 28 сутки п. и. лошадей опытной (n=4) и контрольной (n=4) групп подвергли контрольному заражению эпизоотическим штаммом А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) вируса гриппа интраназальным способом с помощью шприца-распылителя в дозе $8,0 \text{ lg ЭИД}_{50}$ /мл (в каждую ноздрю).

За зараженными лошадьми опытной и контрольной групп в течение 28 суток вели клиническое наблюдение с ежедневным измерением температуры тела животных. Клиническое состояние инфицированных животных оценивается по бальной системе, описанной в опыте по определению безвредности вируса.

Для оценки степени репродукции вируса в верхних дыхательных путях у лошадей опытной и контрольной групп на 3, 7, 14 сутки после заражения брали пробы носовых смывов в пробирки с 1 мл транспортной вирусной среды (стерильный раствор телячьего инфузионного бульона, фракция V бычьего альбумина, гентамицина сульфата и нистатина) для титрования на 10-суточных куриных эмбрионах. Специфичность вируса, выделенного из носоглоточных смывов, определяли с помощью коммерческой экспресс тест-системы Directigen Flu A (Becton-Dickinson, США).

Статистическая обработка экспериментальных данных

Определяли среднее значение выборки ($\bar{X}$), среднеквадратичную ошибку (m) и доверительный интервал средних значений. Достоверность различий между показателями ($p < 0,05$) определяли с применением критерия Стьюдента.

Результаты исследований

В первых сериях исследований оценивали безвредность реассортантного холодаадаптированного штамма А/НК/Отар/6:2/2010 вируса гриппа на лошадях. По результатам проведенных исследований установлено, что испытуемый штамм вируса безвреден для жеребят годовалого возраста при интраназальном введении. Общее состояние жеребят



Рис. 1. Динамика изменения температуры тела жеребят опытной и контрольной групп, инфицированных реассортантным холодаадаптированным штаммом А/НК/Отар/6:2/2010 вируса гриппа.



Рис. 2. Динамика проявления клинических признаков заболевания (по балльной системе) у животных опытной и контрольной групп после контрольного заражения эпизоотическим вирусом А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8).

как опытной, так и контрольной групп в течение 28 суток наблюдения было в пределах нормы, слезотечение, слизисто-гнойное выделение, признаки конъюнктивита или истечение из носа у инфицированных жеребят не наблюдались, температура тела животных была в пределах нормы (рис. 1).

В верхних отделах органов дыхания животных опытной группы ($n=4$) репродукция реассортантного холодаадаптированного вируса не происходила, так как в носоглоточных смывах инфицированных лошадей на 3, 7 и 14 сутки исследования вирус выделен не был. В носоглоточных смывах животных контрольной группы ($n=4$), не подвергнутой инфицированию, вирус также не был обнаружен.

При оценке динамики накопления антигеммагглютинирующих антител к вирусу гриппа лошадей субтипа H3 у инфицированных животных было установлено, что реассортантный холодаадаптированный штамм



Рис. 3. Слизистые выделения из носа лошади (контрольная группа), инфицированной эпизоотическим вирусом А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8).

Таблица 1.

**Результаты клинического наблюдения за животными опытной и контрольной групп
после контрольного заражения эпизоотическим вирусом А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8)**

№ опытной и контрольной лошади	Дни после инфицирования																												Общ. сум- ма	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27		28
Лошадь № 1 (опытная)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Лошадь № 2 (опытная)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Лошадь № 3 (опытная)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Лошадь № 4 (опытная)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Лошадь № 5 (контрольная)	0	0	1 ^д	2 ^а	2 ^а	1 ^а	1 ^г	0	0	4 ^{абг}	4 ^{абв}	4 ^{абг}	4 ^{абг}	4 ^{абг}	4 ^{абг}	5 ^{абгд}	4 ^{абг}	3 ^{абг}	2 ^{бг}	2 ^{бг}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	47
Лошадь № 6 (контрольная)	0	0	0	2 ^а	0	1 ^а	0	0	0	2 ^а	3 ^{аб}	4 ^{абд}	3 ^{аб}	3 ^{аб}	3 ^{аб}	3 ^{аб}	4 ^{абг}	4 ^{абг}	3 ^{аб}	2 ^{аб}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	37
Лошадь № 7 (контрольная)	0	0	1 ^а	2 ^а	2 ^а	1 ^а	2 ^а	2 ^а	2 ^а	3 ^{аб}	3 ^{аб}	4 ^{абд}	3 ^{аб}	4 ^{абд}	3 ^{аб}	3 ^{аб}	3 ^{аб}	3 ^{аб}	2 ^{аб}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	43	
Лошадь № 8 (контрольная)	0	1 ^д	0	2 ^а	0	0	1 ^г	3 ^{аб}	3 ^{аб}	3 ^{аб}	3 ^{аб}	5 ^{абгд}	4 ^{абг}	4 ^{абг}	4 ^{абг}	4 ^{абг}	4 ^{абг}	3 ^{аб}	2 ^{аб}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	46	

Примечание: а – признаки нарушения общего состояния (угнетение, снижение или потеря аппетита и т. д.); б – признаки нарушения дыхания (учащенное дыхание, кашель и т. д.); в – признаки нарушения состояния глаз (слезотечение, конъюнктивит и т. д.); г – признаки нарушения состояния носа (различной степени выделения из носа, чихание и т. д.); д – повышение температуры тела.

А/НК/Отар/6:2/2010 вируса гриппа не формирует детектируемый уровень антител в РТГА на 7, 14 и 28 сутки п. и., то есть не обладает антигенными свойствами. У животных контрольной группы антитела к вирусу гриппа лошадей субтипа НЗ в течение всего срока испытания также не были обнаружены.

В дальнейших исследованиях для подтверждения протективных свойств реассортантного холодаадаптированного штамма А/НК/Отар/6:2/2010 на 28 сутки после инфицирования лошадей опытной (n=4) и контрольной (n=4) групп подвергли контрольному заражению эпизоотическим штаммом А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ. Результаты исследований показаны в таблице 1 и на рисунках 2, 3.

В опытной группе животных (инфицированных штаммом А/НК/Отар/6:2/2010), подвергнутых контрольному заражению эпизоотическим вирусом, в течение всего срока наблюдения не отмечались клинические признаки гриппозной или какой-либо другой инфекции (табл. 1, рис. 2), температура тела животных была в пределах нормы (рис. 4).

Анализ динамики проявления клинических признаков заболевания у инфицированных животных (n=4) контрольной группы (рис. 2) показал, что признаки заболевания у зараженных животных стали проявляться уже с первых суток (0,25±0,25 баллов) после инфицирования (п. и.) и достигли своего максимального пика на 11 сутки

Таблица 2.

Титр вируса в носоглоточных смывах лошадей опытной и контрольной групп после контрольного заражения эпизоотическим вирусом А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8)

Номер опытной и контрольной лошади	Титр вируса в носоглоточных смывах лошадей, lg ЭИД ₅₀ /мл		
	3 сут.*	7 сут.*	14 сут.
Лошадь № 1 (опытная)	-	-	-
Лошадь № 2 (опытная)	-	-	-
Лошадь № 3 (опытная)	-	-	-
Лошадь № 4 (опытная)	-	-	-
Лошадь № 5 (контрольная)	3,20±0,14	1,78±0,08	-
Лошадь № 6 (контрольная)	1,45±0,0	-	-
Лошадь № 7 (контрольная)	1,53±0,08	-	-
Лошадь № 8 (контрольная)	2,45±0,14	-	-

Примечание: «-» вирус не обнаружен; «*» – $P < 0,005$, положительно реагировали в тест-системе Directigen Flu A.

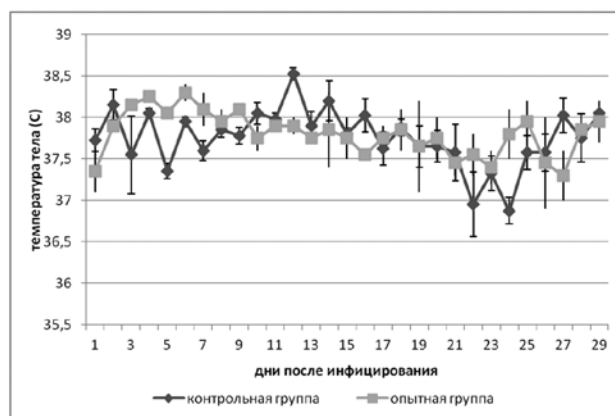


Рис. 4. Динамика изменения температуры тела животных опытной и контрольной групп после контрольного заражения эпизоотическим вирусом А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8).

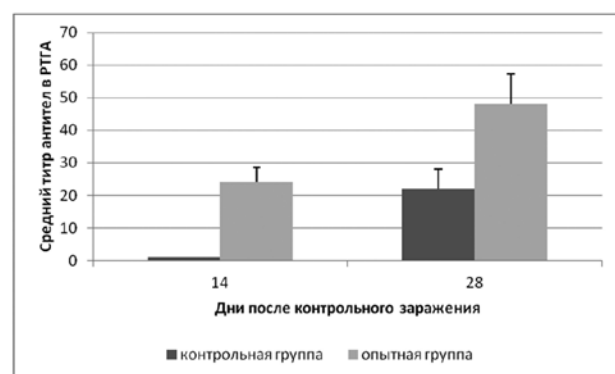


Рис. 5. Динамика накопления антител у инфицированных животных опытной и контрольной групп в РТГА.

п. и. ($4,25 \pm 0,25$ баллов). Проявление клинических признаков заболевания в контрольной группе животных продолжалось вплоть до 19 суток п. и. ($1,0 \pm 0,57$ баллов). При этом клинические признаки в пиковой фазе за-

болевания (табл. 1) проявлялись в виде угнетения, снижения или потери аппетита у животных, кашля (2–5 раз в 10 минут), слезотечения и различной степени выделения из носа (рис. 3). Общая сумма баллов при оценке клинических признаков заболевания в опытной группе была в пределах от 37 до 47 баллов. Следует отметить, что температура тела животных в контрольной группе (рис. 4) в течение всего срока наблюдения (28 сут.) была в пределах нормы ($37,5\text{--}38,5$ °C), за исключением незначительного увеличения температуры тела животных ($38,5 \pm 0,07$ °C) в пиковой фазе заболевания (11 сутки п. и.).

Анализ репродукции эпизоотического вируса (табл. 2) в верхних органах дыхания животных опытной группы ($n=4$) показал, что вакцинация лошадей реассортантным холодадаптированным штаммом А/НК/Отар/6:2/2010 полностью предупреждает выделение вируса в окружающую среду через верхние органы дыхания в течение срока испытания (до 14 суток). В то время как у 100 % инфицированных животных контрольной группы на 3 сутки п. и. отмечено выделение вируса в титрах от $1,45 \pm 0,0$ до $3,2 \pm 0,14$ lg ЭИД₅₀/мл. На 7 сутки п. и. выделение вируса было отмечено лишь у одного животного (лошадь № 5) в титре $1,78 \pm 0,08$ lg ЭИД₅₀/мл, на 14 сутки п. и. ни у одной лошади выделение вируса через верхние органы дыхания отмечено не было.

При оценке динамики накопления антител к вирусу гриппа лошадей субтипа H3

у животных контрольной группы (рис. 5) было установлено, что эпизоотический вирус А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8), также как и реассортантный холодоадаптированный вирус, не обладает достаточно высокими антигенными свойствами, так как у инфицированных животных на 14 сутки п. и. не были обнаружены антитела в РТГА, а на 28 сутки п. и. выявленный титр антител в РТГА (22 ± 6) был чуть выше детектируемого уровня. Напротив, у животных опытной группы, которые предварительно были привиты реассортантным холодоадаптированным штаммом А/НК/Отар/6:2/2010, антитела к вирусу гриппа лошадей субтипа H3 в РТГА были обнаружены уже на 14 сутки п. и. в титре $24 \pm 4,5$, а на 28 сутки п. и. достигли титра 48 ± 9 .

Обсуждение результатов

Настоящие исследования посвящены экспериментальному изучению безвредности и иммуногенности реассортантного холодоадаптированного штамма А/НК/Отар/6:2/2010 со структурой генома 6 : 2 (6 генов от донора и 2 гена от актуального вируса), полученного методом классической генетики в НИИПББ из штаммов: донора аттенуации А/Гонконг/1/68/162/35 (H3N2) и эпизоотического вируса А/лошадь/Отар/764/07(H3N8), выделенного на территории Республики Казахстан в 2007 году. Результаты исследований, представленные в настоящей работе, позволяют определить принципиальную возможность разработки живой аттенуированной вакцины против гриппа лошадей (А/H3N8) на основе реассортантного холодоадаптированного штамма А/НК/Отар/6:2/2010.

Предпосылкой для разработки в Казахстане живой аттенуированной вакцины против гриппа лошадей из реассортантного холодоадаптированного вируса послужили литературные данные [3, 9], свидетельствующие о том, что данный тип вакцины по сравнению с инактивированными (цельновирионные и субъединичные) препаратами обладает высокой степенью иммуногенности и более длительным иммунитетом (не менее 1 года) при однократном применении. Наиболее значимым преимуществом живой аттенуи-

рованной вакцины является то, что она формирует иммунный ответ, сходный с таковым при естественной инфекции. При этом преимущественно развивается клеточный иммунитет. Кроме того, у привитых животных образуются иммуноглобулины класса А или так называемые секреторные антитела, способные нейтрализовать болезнетворный агент в самой ранней стадии развития инфекционного процесса в верхних дыхательных путях. В производственных условиях высокую практическую ценность также представляет удобный способ иммунизации (интраназальный) лошадей, который по сравнению с внутримышечным введением не травматичен и расширяет возможности массовой иммунизации животных в случаях обострения эпизоотической обстановки по данному заболеванию [8].

На фоне перечисленных достоинств живых вакцин некоторыми учеными ставится вопрос о вероятности мутации или реассортации вакцинного вируса с другими дикими вирусами с последующим появлением патогенных вариантов возбудителя. Однако несмотря на это, в настоящее время лицензирована и разрешена к применению живая аттенуированная вакцина (FluMist®) для здравоохранения, в которой использована смесь двух типов вируса (H1N1 и H3N2). Кроме того, многолетний опыт России и Восточноевропейских стран по использованию живых человеческих вакцин против гриппа показал, что применение этих вакцин не способствует появлению новых вирусных реассортантов гриппа. В исследованиях на лошадях установлено, что холодоадаптированный штамм проявляет фенотипическую стабильность, не вызывает клинических осложнений и не передается при контакте другим животным [3].

Следует отметить, что Казахстан, в лице НИИПББ, в период возникновения и распространения гриппа лошадей в республике в 1992–1995 гг., также как и другие государства мира, разработал собственную технологию изготовления инактивированной цельновирионной вакцины против гриппа лошадей. Технология получения вакцины основывалась на использовании широко известных

штаммов А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) и А/лошадь 2/Майами/63 (H3N8). По разработанной технологии вирусосодержащие суспензии производственных штаммов, разработанные в системе куриных эмбрионов, инаktivировались формальдегидом, подвергались очистке и концентрированию методами двукратного замораживания-оттаивания и диализа. В качестве иммуностимуляторов вакцина содержала гидроокись алюминия и сапонин. Бустерная вакцинация разработанным препаратом лошадей обеспечивала у них формирование иммунитета продолжительностью 6–12 мес. Но в технологическом аспекте разработанная вакцина имеет ряд свойственных всем инаktivированным препаратам недостатки, поэтому, учитывая данные мировой литературы по вакцинам против гриппа лошадей, мы остановились на технологии получения высокоэффективной живой вакцины из реассортантного холодоадаптированного штамма А/Отар/НК/6:2/2010 (H3N8).

Согласно требованиям МЭБ [6], предъявляемым к вакцинным препаратам против гриппа лошадей, новые вакцинные штаммы предварительно должны быть испытаны на безвредность и иммуногенность, поэтому целью настоящих исследований являлось изучение безвредности и иммуногенности реассортантного холодоадаптированного штамма А/НК/Отар/6:2/2010 вируса гриппа на лошадях.

Анализ экспериментальных данных позволяет заключить, что реассортантный холодоадаптированный штамм А/НК/Отар/6:2/2010 безвреден для жеребят годовалого возраста при интраназальном инфицировании в дозе $2 \times 8,0 \text{ lg ЭИД}_{50}$ /животное (по 1 мл в каждую ноздрю). В период срока наблюдения (28 суток) клиническое состояние инфицированных животных, оцениваемое по бальной системе, было в пределах нормы, слезотечение, слизисто-гнойное выделение, признаки конъюнктивита или истечение из носа у жеребят не наблюдались, температура тела животных была в пределах нормальных значений (рис. 1), репродукция вируса (3, 7, 14 сутки п. и.) в верхних органах дыхания не установлена.

При оценке иммуногенных возможностей вируса на жеребят установлено, что реас-

сортантный холодоадаптированный штамм А/НК/Отар/6:2/2010 не формирует детектируемый уровень антител в РТГА на 7, 14 и 28 сутки п. и., то есть не обладает достаточными антигенными свойствами. Однако при контрольном заражении жеребят (опытная группа) эпизоотическим штаммом А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ они в 100 % случаев проявляли устойчивость к заболеванию, в течение всего срока наблюдения клиническое состояние животных было в пределах нормы (табл. 1, рис. 2), температура тела животных также имела нормальные значения (рис. 4), репродукция вируса (3, 7, 14 сутки п. и.) в верхних органах дыхания установлена не была. При этом в контрольной группе инфицированные жеребята проявляли ярко выраженные клинические признаки гриппозной инфекции (угнетение, снижение или потеря аппетита, кашель, слезотечение и различной степени выделения из носа) с выделением большого количества вируса (от $1,45 \pm 0,0$ до $3,2 \pm 0,14 \text{ lg ЭИД}_{50}$ /мл) в окружающую среду вплоть до 7 суток п. и.

Следует отметить, что температура тела животных в контрольной группе (рис. 4) в течение всего срока наблюдения (28 суток) была в пределах нормы ($37,5\text{--}38,5^\circ\text{C}$), за исключением незначительного увеличения температуры тела животных ($38,5 \pm 0,07^\circ\text{C}$) в пиковой фазе заболевания (11 сутки п. и.), что, по-видимому, связано со штаммовыми особенностями контрольного вируса, о чем свидетельствуют данные Юрова К. П. [10], согласно которым при доброкачественной форме гриппа повышение температуры тела может регистрироваться лишь у отдельных лошадей. Также следует отметить, что контрольный вирус А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) в опыте на лошадях, также как и реассортантный холодоадаптированный штамм А/НК/Отар/6:2/2010, не показал высокие антигенные свойства, о чем свидетельствует накопление низкого титра антител в РТГА на 28 сутки после инфицирования.

Экспериментальные данные, полученные в ходе изучения иммуногенности реассортантного холодоадаптированного штамма А/НК/Отар/6:2/2010 на лошадях, согласуются с данными Townsend H. G. et al. [9], исследова-

ниями которых впервые на основе аттенуированного холодоадаптированного дикого штамма Кентукки/91 H3N8 была получена живая вакцина против гриппа лошадей А/Н3N8 (Flu Avert™ I.N., Intervet), которая при однократном применении у пони формирует у них напряженный иммунитет (преимущественно клеточный), обеспечивающий надежную защиту животных от гриппа в течение 1 года.

Таким образом, экспериментальное изучение безвредности и иммуногенности реассортантного холодоадаптированного штамма А/НК/Отар/6:2/2010 на жеребят годовалого возраста показало, что по изучаемым показателям вирус соответствует требованиям МЭБ, предъявляемым к новым вакцинным штаммам ВГЛ, и в этой связи может быть использован для разработки живой вакцины против гриппа лошадей.

Выводы

1. Реассортантный холодоадаптированный штамм А/НК/Отар/6:2/2010 вируса гриппа безвреден для жеребят годовалого возраста при интраназальном инфицировании в дозе $2 \times 8,0 \text{ lg ЭИД}_{50}/\text{животное}$ (по 1 мл в каждую ноздрю). В период срока наблюдения (28 суток) клиническое состояние и температура тела животных была в пределах нормы, слезотечение, слизисто-гнойное выделение, признаки конъюнктивита или истечение из носа не наблюдались, репродукция вируса в верхних органах дыхания не установлена.

2. Реассортантный холодоадаптированный штамм А/НК/Отар/6:2/2010 вируса гриппа у инфицированных жеребят не формирует детектируемый уровень антител в РТГА на 7, 14 и 28 сутки после инфицирования.

3. Жеребята годовалого возраста, привитые реассортантным холодоадаптированным штаммом А/НК/Отар/6:2/2010 вируса гриппа, при контрольном заражении эпизоотическим штаммом А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ в дозе $8,0 \text{ lg ЭИД}_{50}/\text{мл}$ (в каждую ноздрю) в 100 % случаев проявляют устойчивость к гриппозной инфекции. В течение всего срока наблюдения клиническое состояние и температура тела животных была в пределах нормы, репродукция вируса в верхних органах дыхания установлена не была.

4. Контрольная группа жеребят при заражении эпизоотическим штаммом А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ в дозе $8,0 \text{ lg ЭИД}_{50}/\text{мл}$ (в каждую ноздрю) проявляет ярко выраженные клинические признаки гриппозной инфекции (угнетение, снижение или потеря аппетита, кашель, слезотечение и различной степени выделения из носа) с выделением большого количества вируса (от $1,45 \pm 0,0$ до $3,2 \pm 0,14 \text{ lg ЭИД}_{50}/\text{мл}$) в окружающую среду вплоть до 7 суток после инфицирования.

5. По показателям безвредности и иммуногенности на лошадях реассортантный холодоадаптированный штамм А/НК/Отар/6:2/2010 соответствует требованиям МЭБ, предъявляемым к новым вакцинным штаммам ВГЛ, и в этой связи может быть использован для разработки живой вакцины против гриппа лошадей.

Список литературы

1. Сидорчук, А. А. Инфекционные болезни животных / А. А. Сидорчук, Б. Ф. Бессарабов, Е. С. Воронин и др. – М. : Колос, 2007. – 671 с.
2. Юров, К. П. Инфекционные болезни лошадей / К. П. Юров. – М. : Росагропромиздат, 1991. – 192 с.
3. Chambers, T. M. A new modified live equine influenza virus vaccine: phenotypic stability, restricted spread and efficacy against heterologous virus challenge / T. M. Chambers, R. E. Holland, L. R. Tudor et al. // *Equine Vet J.* – 2001. – Vol. 33. – № 7. – P. 630–6.
4. Hannant, D. Duration of circulating antibody and immunity following infection with equine influenza / D. Hannant, J. A. Mumford, D. M. Jesset // *Veterinary Record.* – 1988. – Vol. 122. – P. 125–128.
5. Holmes, D. F. Live temperature sensitive equine-2 influenza A virus vaccine : production and efficacy in experimental ponies / D. F. Holmes, L. M. Lamb, L. Coggins, B. R. Murphy, J. H. Gillespie // VI. Proceedings of the Sixth International Conference. Newmarket: R&W Publications Ltd. – 1991. – P. 253–8.
6. OIE. Terrestrial manual equine influenza. – 2008, chapter 2.5.7. – P. 877–881.
7. Paillet, R. Vaccination against equine influenza: Quid novi? / R. Paillet, D. Hannant, J. H. Kydd, J. M. Daly // *Vaccine.* – 2006. – Vol. 24. – P. 4047–4061.
8. Soboll, G. Mucosal co-administration of cholera toxin and influenza virus hemagglutinin-DNA in ponies generates a local IgA response / G. Soboll, K. M. Nelson, E. S. Leuthner et al. // *Vaccine.* – 2003. – Vol. 21. – P. 3081–3092.
9. Townsend, H. G. Efficacy of a cold-adapted, intranasal, equine influenza vaccine: challenge trials / H. G. Townsend, S. J. Penner, T. C. Watts et al. // *Equine Vet J.* – 2001. – Vol. 33. – № 7. – P. 637–43.
10. Wilson, W. D. Equine influenza / W. D. Wilson // *Vet Clin North Am Equine Pract.* – 1993. – Vol. 9. – № 2. – P. 257–82.

УДК 57.083.12-873.21

Ключевые слова: микобактерии, бактериологические исследования, генотипирование, 16S-23S рРНК

Keywords: *mycobacterium*, *bacteriological analysis*, *genotyping*, *16S-23S rRNA*

Тупота Н. Л., Ионина С. В., Терновой В. А., Тупота С. Г., Донченко Н. А.

ИЗУЧЕНИЕ MYCOBACTERIUM ARUPENSE, ВЫДЕЛЕННОГО НА ТЕРРИТОРИИ СИБИРСКОГО РЕГИОНА *THE STUDY OF MYCOBACTERIUM ARUPENSE ALLOCATED WITHIN THE TERRITORY OF THE SIBERIAN REGION*

¹ГНУ «Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Россельхозакадемии»

Адрес: 630501, Новосибирская область, пос. Краснообск, а/я 8. Тел. (383) 348-04-95

¹*State Scientific Establishment Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East,
Siberian Branch of the Russian Academy of Agricultural Sciences*

Address: 630501, Russia, Novosibirsk Region, Krasnoobsk, P. O. Box 8. Tel. +7 (383) 348-04-95

²Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Адрес: 630559, Новосибирская область, пос. Кольцово. Тел. (383) 363-48-25

²*State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector"*

Address: Russia, Novosibirsk Region, Koltsovo. Tel. +7 (383) 363-48-25

Тупота Наталья Леонидовна, к. б. н., ст. научн. сотрудник¹

Tupota Natalya L., Ph.D., Senior Research Scientist¹

Ионина Светлана Владимировна, к. б. н., ст. научн. сотрудник¹

Ionina Svetlana V., Ph.D., Senior Research Scientist¹

Терновой Владимир Александрович*, к. б. н., зав. лабораторией молекулярной
эпидемиологии особо-опасных инфекций²

*Ternovoi Vladimir A., Ph.D., Head of the Laboratory of Molecular
Epidemiology of Highly Dangerous Infections²*

Тупота Сергей Григорьевич, к. в. н., ст. научн. сотрудник¹

Tupota Sergey G., Ph.D., Senior Research Scientist¹

Донченко Николай Александрович, д. в. н., директор¹

Donchenko Nikolay A., Doctor of Veterinary Science, Director¹

Аннотация. Впервые на территории Новосибирской области получен изолят *Mycobacterium arupense*, изучен фрагмент межгенной последовательности 16S-23S рРНК, а также представлены его биологические и биохимические характеристики.

Summary. For the first time within the territory of the Novosibirsk Region the isolate of *Mycobacterium arupense* was received, the fragment of 16S-23S rRNA intergenic sequence was studied and also its biological and biochemical characteristics were presented.

Введение

В эпизоотологии микобактериальных инфекций проблема видового состава микобактерий и их региональных особенностей имеет не только теоретическое, но и большое практическое значение, так как создает основу для дифференцированного проведения профилактических и оздоровительных мероприятий. Определение видовой принадлежности выделенных культур микобактерий из организма животных и сред их обитания позволяет определить ареал их распространения, источники инфицирования и патогенное воздействие на различные виды животных и человека [3].

Актуальность идентификации микобактерий диктуется необходимостью получения новых данных о возбудителях туберкулеза и нетуберкулезных микобактерий, циркулирующих среди животных в современных условиях ведения животноводства. В большинстве ветеринарных лабораторий идентификация микобактерий осуществляется определением возбудителей туберкулеза и дифференциацией нетуберкулезных микобактерий по группам Раньона (скотохромогенные, фотохромогенные, нефотохромогенные и быстрорастущие микобактерии) [3]. Однако в настоящее время описано более 140 видов микобактерий, причем число ати-

пичных микобактерий постоянно растет [10, 14], что требует пересмотра и дополнения существующей классификации.

В зарубежной научной литературе появляются сообщения о распространении потенциально нового вида микобактерий – *Mycobacterium agurpense* среди людей, грызунов и насекомых на территории Японии, Африки и Чехии [12, 9, 13]. Впервые он был выделен из образцов мокроты, полученной от пациента в 2006 году на территории США [8]. В том же году он был выделен на территории Японии от пациента со схожей симптоматикой [12]. В Тайване в 2008 году *M. agurpense* обнаружен у пациента с тендовангитом, больного диабетом [15]. На территории Кореи данный вид микобактерий был обнаружен в пробах поверхностных вод [11]. Однако упоминаний о данном микроорганизме, циркулирующем на территории России в доступных нам источниках информации мы не обнаружили.

Cloud J. I., Meyer J. J. et al [8] классифицируют этот вид микобактерий как элемент *M. terrae* complex, включающий *M. terrae*, *M. nonchromogenicum*, *M. hiberniae* и *M. triviale*. Возможно, ранее микроорганизм не идентифицировали, а вызываемые им заболевания диагностировали неверно. Однако использование молекулярно-биологических методов исследования способствовало решению этой проблемы.

При исследовании биоматериала, полученного от свиньи в Новосибирской области, нами была выделена культура микобактерий, идентифицированная как микобактерии III группы по Раньону [7]. В дальнейшем было проведено молекулярно-генетическое изучение данного изолята.

Целью работы явилось изучение свойств выделенной культуры.

Материалы и методы

Лабораторные исследования по изоляции микобактерий, последующей их идентификации проводили согласно «Наставления по диагностике туберкулеза животных» [4]. Для обработки биоматериала использовали метод А. П. Аликаевой. Посев материала проводили на питательную среду Финн-2. С целью

дифференциации культуры накопленную бактериальную массу пересевали на различные питательные среды – яичную среду с салицилатом натрия, мясопептонный агар и мясопептонный бульон – и культивировали при различных температурных режимах: 20–22 °С, 37 °С и 45 °С. В качестве биохимических тестов использовали реакцию гидролиза твин-80 и тест на устойчивость к 5 % натрия хлориду, редукцию нитратов с диметиламинобензальдегидом и определение амидной активности с мочевиной.

Выделение суммарной ДНК из культур проводили, используя метод сорбции на силикагеле с применением набора ДНК-сорб-Б (ЦНИИЭ) согласно прилагаемой инструкции.

Полимеразная цепная реакция для выявления специфической ДНК *Mycobacterium* spp. проводилась с использованием пары праймеров на фрагмент межгенной последовательности 16S-23S рПНК:

5'-ACCTCCTTTCTA AGGGCACCC-3' и

5'-GATGCTCGCAACCACTATTCA-3' [16].

Химический синтез праймеров был осуществлен в ООО «Лаборатория Меди-ген» (Новосибирск). Постановку ПЦР осуществляли на амплификаторе «Терцик» [6, 7], используя следующие параметры: 96 °С × 5 мин. (1 цикл), 94 °С × 30 сек, 60 °С × 30 сек., 72 °С × 1 мин. (35 циклов), 72 °С × 10 мин. [5].

Полученные в ПЦР фрагменты анализировали методом электрофореза в 1,5%-м агарозном геле в присутствии бромистого этидия. В качестве маркера использовали pUC19/Kzo9 I и pBluescript/Msp. Результаты электрофореза учитывали в УФ-свете на трансиллюминаторе с длиной волны 246 нм. Длина полученного в ПЦР специфического фрагмента составила 247 п. н.

Определение нуклеотидной последовательности выделенного ПЦР-фрагмента проводили на автоматическом секвенаторе “Beckman CEQ2000XL” (Beckman Coulter, Inc.) согласно инструкции производителя. Нуклеотидные последовательности для проведения филогенетического анализа были получены из базы данных GenBank. Обработка последовательностей проводилась с использованием специализированных

программных пакетов MEGA (PSU, США) и DNASTAR (DNASStar Inc., США).

Результаты и обсуждение

На вскрытии свиньи в лимфатических узлах были обнаружены очаги с кашеобразным содержимым размером с просыаное зерно, наблюдались кровоизлияния и стертость между слоями органа. При микроскопии полученной культуры, окрашенной по Циль – Нильсену, микобактерии представляли собой короткие утолщенные зернистые кислотоустойчивые палочки красного цвета, имеющие изогнутую форму. Располагались скоплениями и образовывали нити. Бактерии не образовывали пигмент ни на свету, ни в темноте, но со временем могли приобретать желтую окраску. Наблюдалось отсутствие роста микобактерий при 20–22 °С и 45 °С, при 37 °С рост был отмечен на 10-е сутки. Рост на мясопептонном агаре появился на 5-е сутки, на мясопептонном бульоне – на 2-е сутки. При пересеве культуры на 7-е сутки на среде Финн-2 появился сплошной рост колоний и представлял собой S-форму. Температурный оптимум составлял 37 °С.

При биохимическом тестировании наблюдалась положительная реакция гидролиза твин-80 (изменение окраски было отмечено на 2-е сутки) и было установлено, что культура не устойчива к 5 % натрия хлориду, обладает амидазной активностью, а способность восстанавливать нитраты проявляется на 60 %.

При посеве биоматериала на питательную среду Финн-II первичный рост колоний обнаружили на 20-й день после посева. Биопробу ставили, используя 1 кролика и 2 морских свинок, которым вводили суспензию биоматериала, содержащую 1 мг культуры в 1 мл физиологического раствора. При эвтаназии кролика, зараженного внутривенно 1 мл суспензии из биоматериала, изменений не обнаружено. Морские свинки, зараженные подкожно такой же дозой, пали через 2,5 месяца, изменений на вскрытии не обнаружено.

Полученной культурой также заражали беспородных белых мышей (20 голов). Для заражения использовали суспензию

3-недельной культуры (1 мг в 1 мл физиологического раствора), которую вводили по 1 мл внутривенно. Животных умерщвляли по 5 голов через каждые 7 дней в течение месяца. При вскрытии осматривали внутренние органы:

- эвтаназия через 7 дней: у одной мыши – увеличение селезенки, другие органы без изменений;

- эвтаназия через 14 дней: изменения в органах отсутствуют;

- эвтаназия через 21 день: у одной мыши – увеличение селезенки, другие органы без изменений;

- эвтаназия через 30 дней: у одной мыши – увеличение селезенки (плотная консистенция), другие органы без изменений. При этом наличие ДНК искомого микроорганизма в органах мышей наблюдалось как через 2, так и через 4 недели после заражения.

В результате изучения культурально-морфологических свойств выделенная культура была отнесена к атипичным микобактериям III группы по Раньону.

Так как фенотипические признаки бактерий могут широко варьировать в зависимости от условий культивирования и от аллельного состояния ответственных за экспрессию генов, было проведено молекулярно-генетическое исследование культуры. При этом праймеры были синтезированы на фрагмент межгенной последовательности 16S-23S рПНК. Учитывая что в отличие от фенотипических и биохимических особенностей 16S-23S рПНК является устойчивой характеристикой, специфической для микроорганизмов на уровне вида, нами были получены фрагменты ДНК, которые по результатам секвенирования были отнесены к потенциально новому виду микобактерий – *M. agupense* [6]. Сибирский вариант оказался генетически близок изоляту *M. agupense*, выделенному в 2006 году на территории Италии [8]. У изолята, полученного в Новосибирской области, имеются нуклеотидные замены, отличающие его от прототипных штаммов. При построении филогенетического дерева *M. agupense* образовал 3 кластера с прототипными штаммами, зарегистрированными ранее в GenBank, которые,

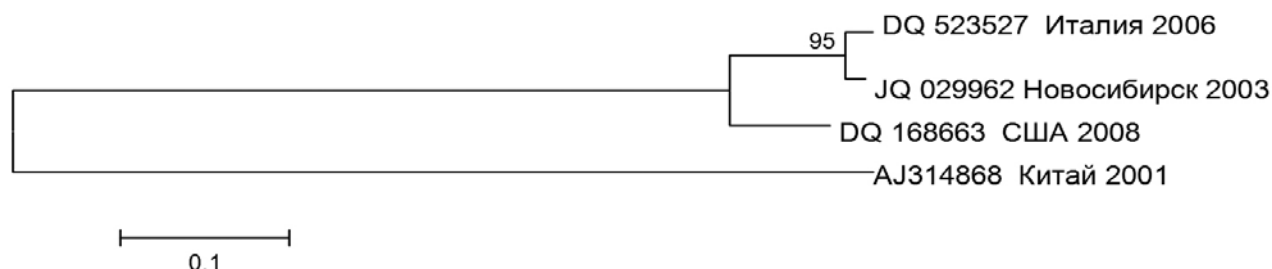


Рис. 1. Консенсусное ML-дерево последовательностей 16S-23S рРНК *M. agurpense*.

в свою очередь, объединяют несколько мелких ветвей. Наибольшую гомологию этот вариант имеет со штаммом *M. agurpense*, изолированным и описанным на территории Италии в 2006 году авторами Тортолли и Мариоттини. При тестировании процедурой бутстрепа *M. agurpense* образовал один клад с указанным изолятом, имея коэффициент подобия 95 % (рис. 1). Для сибирского варианта *M. agurpense* характерны следующие аминокислотные замены в паттернах: NCQ→NRQ, GLF→GQL, PLC→PLW.

Заключение

Таким образом, проведенный комплекс микробиологических и молекулярно-генетических методов исследования позволил идентифицировать потенциально новый вид микобактерий – *Mycobacterium agurpense*, который по совокупности описанных признаков был отнесен к нетуберкулезным (атипичным) микобактериям и впервые был выделен нами на территории России, и Новосибирской области в частности.

Необходимо отметить, что данный возбудитель был выделен из биоматериала, в котором были обнаружены изменения, характерные для типичной туберкулезной инфекции. Следовательно, идентифицированные микобактерии обладают достаточно выраженной патогенностью в отношении сельскохозяйственных животных и могут обладать потенциальной патогенностью для человека.

В настоящее время патология, вызываемая атипичными микобактериями, – микобактериозы – широко распространена. При этом проблема нетуберкулезных микобактерий, а также возможное усиление их вирулентности, становится все более актуальной. Таким образом, выявление всех свойств

и характеристик атипичных микобактерий в различных регионах позволит наиболее эффективно разрабатывать методы лечения и дальнейшей ликвидации инфекции, вызываемой ими.

Список литературы

1. Вартапетян, А. Б. Полимеразная цепная реакция / А. Б. Вартапетян // Молекулярная биология. – 1991. – Т. 25. – Вып. 4. – С. 926–936.
2. Гришина, Т. Д. Идентификация возбудителя туберкулеза в клиническом материале с помощью метода полимеразной цепной реакции / Т. Д. Гришина [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1995. – № 1. – С. 36–38.
3. Касьянова, Е. А. Оптимизация комплекса видовой идентификации микобактерий : Дис...канд. ветеринар. наук. – М., 2010. – 216 с.
4. Наставление по диагностике туберкулеза животных : офиц. текст. – М., 2002. – 69 с.
5. Першикова, Н. Л. Использование полимеразной цепной реакции для обнаружения ДНК микобактерий туберкулеза / Н. Л. Першикова, Н. А. Донченко // Вестник КрасГАУ. – 2007. – № 5. – С. 129–131.
6. Першикова, Н. Л. Полиморфизм ДНК микобактерий, вызывающих неспецифические туберкулиновые реакции у сельскохозяйственных животных: автореф. дис...канд. биол. наук. – Новосибирск, 2008. – 21 с.
7. Першикова, Н. Л. Изучение фрагмента гена 16S-23S рРНК *Mycobacterium agurpense*, впервые выделенного на территории Сибирского региона / Н. Л. Першикова, В. А. Терновой // Актуальные проблемы сельского хозяйства горных территорий: материалы II-й Международной научно-практической конференции. – Горно-Алтайск, 2010. – С. 115–117.
8. Cloud, J. L. *Mycobacterium agurpense* sp. nov., a non-chromogenic bacterium isolated from clinical specimens / J. L. Cloud, J. J. Meyer, J. I. Pounder et al. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2006. – Vol. 56. – P. 1413–1418.
9. Durnez, L. First findings of mycobacteria in African rodents and insectivores using stratified pool screening / L. Durnez, M. Eddyani, G. F. Mgode et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2007.
10. Kazda, J. The Ecology of *Mycobacteria*: Impact on Animal's and Human's Health / J. Kazda, I. Pavlik,

III J. O. Falkinham, K. Hruska (eds.) ; 1st ed. – Springer, 2009. – xviii+522 pp.

11. Lee, E. S. Occurrence and molecular differentiation of environmental mycobacteria in surface waters / E. S. Lee, M. Y. Lee, S. H. Han, J. O. Ka // Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2008. – 18. – P. 1207–1215.

12. Masaki, T. Mycobacterium kumamotonense sp. Nov. Recovered from Clinical Specimen and the First Isolation Report Mycobacterium arupense in Japan: Novel Slowly Growing, Nonchromogenic Clinical Isolates Related to Mycobacterium terrae Complex / T. Masaki, K. Ohkusu, H. Hata et al. // Microbiol. Immunol. – 2006. – Vol. 50. – P. 889–897.

13. Slany, M. Mycobacterium arupense among the isolates of non-tuberculous mycobacteria from

human, animal and environmental samples / M. Slany, J. Svobodova, A. Ettlova // Veterinarni Medicina. – 55, 2010 (8). – P. 369–376.

14. Tortoli, E. The new mycobacteria: an update / E. Tortoli // FEMS Immunology and Medical Microbiology. – 2006. – 48. – P. 159–178.

15. Tsai, T. F. Tenosynovitis caused by Mycobacterium arupense in a patient with diabetes mellitus / T. F. Tsai, C. C. Lai, I. C. Tsai, C. H. Chang, C. H. Hsiao, P. R. Hsueh // Clin. Infect. Dis. – 2008. – V. 47. – P. 861–863.

16. Xiong, L. Use of PCR and Reverse Line Blot Hybridization Macroarray Based on 16S-23S rRNA Gene Internal Transcribed Spacer Sequences for Rapid Identification of 34 Mycobacterium Species / L. Xiong, F. Kong, Y. Yang et al. // J. Clin. Microbiol. – 2006. – V. 44. – № 10. – P. 3544–3550.

реклама

Сканеры УЗИ “РАСКАН”

*Достоверность, доступность и простота
ультразвуковых исследований в ветеринарии*

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

**Контроль стельности в
животноводстве и
продуктивности в
птицеводстве**

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



**Переносные приборы
с возможностями
стационарных
Легкие (от 2,5 кг),
компактные с
автономным
питанием. Кейс**



**Конвексные, линейные,
полостные мультисекторные
датчики высокой плотности
Рабочие частоты
От 2,5 до 10 МГц**



**Секторные датчики
двухчастотные
анулярные
Рабочие частоты
от 2,5 до 7,5 МГц**



**Организованы курсы
ветеринарные УЗИ**

**НПП
“РАТЕКС”**

**С 1991
года на рынке
УЗИ**

**199178, С.-Петербург, ул. Донская, д. 19, пом.1Н
Тел./факс: (812)321-89-74, 321-57-71, (950)030-30-41
E-mail: rateks@rateks.com http://rateks.com**

УДК 591.69-9

Ключевые слова: альвеолярный эхинококкоз, метастода, штамм, *Echinococcus multilocularis*, генотипKey words: *alveolar echinococcosis*, *metacystoda*, *strain*, *Echinococcus multilocularis*, *genotype*

Коняев С. В., Янагида Т., Кривопапов А. В., Дупал Т. А., Абрамов С. А.,
Накао М., Сако Я., **Гуляев В. Д.**, Ито А.

**ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ АЛЬВЕОЛЯРНОГО
ЭХИНОКОККОЗА (*ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS*) В ЗАПАДНОЙ СИБИРИ**
*GENOTYPIC CHARACTERIZATION OF THE CAUSATIVE AGENT OF ALVEOLAR
ECHINOCOCCOSIS (*ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS*) IN WESTERN SIBERIA*

¹Институт систематики и экологии животных СО РАН

Адрес: 630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 11

¹*Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS*

Address: 630091, Russia, Novosibirsk, Frunze street, 11

²Асакихавский медицинский университет, каф. паразитологии

Адрес: 078-8510, Япония, Хоккайдо, Асахикава, Мидоригаока Хигаши 2-1-1-1

²*Asahikawa Medical University, Dept. of Parasitology*

Address: 078-8510, Japan, Hokkaido, Asahikawa, Midorigaoka Higashi 2-1-1-1

Коняев Сергей Владимирович, к. б. н., научн. сотрудник¹ / *Konyaev Sergey V., Ph.D., Research Scientist¹*Янагида Тетсуя, Ph.D., ассистент профессора² / *Yanagida Tetsuya, Ph.D., Assistant Professor²*Кривопапов Антон Викторович, к. б. н., научн. сотрудник¹ / *Krivopalov Anton V., Ph.D., Research Scientist¹*Дупал Тамара Александровна, к. б. н., ст. научн. сотрудник¹ / *Dupal Tamara A., Ph.D., Senior Research Scientist¹*Абрамов Сергей Александрович, к. б. н., ст. научн. сотрудник¹*Abramov Sergey A., Ph.D., Senior Research Scientist¹*Накао Минору, Ph.D., мл. проф.² / *Nakao Minoru, Ph.D., Associate Professor²*Сако Ясунито, Ph.D., преподаватель² / *Sako Yasushito, Ph.D., Lecturer²*Гуляев Владимир Дмитриевич, д. б. н., проф., вед. научн. сотрудник¹*Gulyaev Vladimir D., Doctor of Biology Science, Professor, Leading Research Scientist¹*Ито Акира, Ph.D., проф., зав. кафедрой² / *Ito Akira, Ph.D., Professor, Head of department²*

Аннотация. Изучены последовательности гена *cox1* изолятов *Echinococcus multilocularis* с территории Кемеровской и Новосибирской областей. Показана принадлежность изолятов к азиатскому генотипу *E. multilocularis*.

Summary. The *cox1* gene sequences of isolate *Echinococcus multilocularis* from Western Siberia were studied. It is shown that isolates belonging to the Asian genotype of *E. multilocularis*.

Введение

Ленточные черви *Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863 являются паразитами млекопитающих с двуххозяиным циклом развития. На личиночной стадии они паразитируют у грызунов, зайцеобразных, реже у других животных и человека. Заражение промежуточных хозяев происходит при проглатывании инвазионных яиц, выделяемых вместе с фекалиями окончательными хозяевами. Половозрелые формы, продуцирующие яйца, развиваются в кишечнике представителей семейств псовых (*Canidae*), реже кошачьих (*Felidae*) после поедания ими промежуточных хозяев. Цестоды *E. multilocularis* являются одними из самых опасных паразитических червей, поражающих человека.

Вызываемая ими болезнь – альвеолярный эхинококкоз является природно-очаговой и распространена на территории Евразии и Северной Америки [17, 2].

Б. И. Альперович выделял пять очагов альвеолярного эхинококкоза на территории СССР. По заболеваемости человека им выделены два крупнейших очага – якутский и сибирский [1]. Н. М. Лукашенко выделял по тому же принципу 9 эндемичных районов, при этом якутский и сибирский очаг, предложенные Альперовичем, были объединены в один [7]. Часть этого эндемичного района располагается на территории Западной Сибири. За прошедшие 56 лет на этой территории зарегистрировано более 750 случаев альвеолярного эхинококкоза у человека.

Большинство случаев заболевания связано с южной частью региона – Алтайским краем и Республикой Алтай. Умеренно высокая заболеваемость наблюдалась в Новосибирской, Омской, Томской и Кемеровской областях. В Новосибирской и Омской областях изучению локальных очагов было уделено достаточное внимание [3, 5, 6, 7, 8]. В других регионах Западной Сибири характеристики локальных природных очагов не были изучены.

Особое внимание исследователей привлекали значительные различия в показателях заболеваемости людей в разных регионах. На основании изучения структуры очагов и биологических особенностей *E. multilocularis* в разных частях ареала было высказано предположение о существовании двух внутривидовых форм – патогенной (штамм от лисицы) и непатогенной (штамм от песка) для человека [11]. Однако исследование всех биологических свойств метацистод, полученных от людей из разных регионов, проблематично.

Альтернативой данному методу могут послужить молекулярно-генетические методы, когда каждый изученный в лабораторных условиях образец *E. multilocularis* маркируется путем анализа последовательности гена, после чего осуществляется поиск этих маркеров во всех доступных образцах или изолятах и сравниваются их свойства. В качестве таких генетических маркеров для цестод семейства Taeniidae используются последовательности митохондриальной ДНК (мтДНК) трех генов: первой субъединицы цитохром-с-оксидазы (*cox1*), цитохрома *b* (*cob*), второй субъединицы NADH дегидрогеназы (*nd2*), наиболее часто используемые для генотипирования ленточных червей. На основании анализа этих генов у цестод *E. multilocularis* были установлены четыре генотипа:

а) европейский генотип, основанный на гаплотипах, выявленных у изолятов с территории центральной Европы [16];

б) азиатский генотип, представленный множеством близкими друг к другу гаплотипов, распространенных на территории Китая, Казахстана, части Монголии, Японии и острове Святого Лаврентия (США) [16];

в) монгольский генотип, описан с территории Внутренней Монголии в Китае [20, 21];

г) североамериканский генотип, обнаруженный в штате Индиана (США) и на острове Святого Лаврентия, где он распространен совместно с азиатским генотипом [16].

У людей, зараженных альвеолярным эхинококкозом, чаще обнаруживается азиатский или европейский генотипы. Известны также четыре случая обнаружения монгольского генотипа у человека. Предполагается, что его способность к инвазированию людей невысока [14]. Подтвержденных молекулярно-генетическими методами находок североамериканского генотипа у человека нет.

Несмотря на то, что на территории Российской Федерации располагаются крупнейшие по масштабам и интенсивности эпидемиологического процесса природные очаги альвеолярного эхинококкоза, в литературе имеется только одно сообщение о генетической принадлежности изолята *E. multilocularis* с территории России к азиатскому генотипу [10]. В связи с этим очевидна необходимость изучения генотипического разнообразия возбудителя альвеолярного эхинококкоза на территории всей Западной Сибири. В данной работе представлены первые результаты такого исследования.

Материалы и методы исследований

Исследовано 844 грызуна, отловленных в 2007–2010 гг. в Алтайском и Красноярском краях, в Новосибирской, Кемеровской, Томской, Тюменской, Омской областях и Республике Алтай. Отловы проводились в различных природных биотопах по стандартной методике с помощью линий живоловок и ловчих канавок. Обследованная территория охватывает различные ландшафтно-географические зоны Сибири, включая степь и лесостепь (Карасук, Шушенское), подтаежные леса (Тюмень, Усть-Ишим, Бакса, Сухоречье), предгорья (Парная, Балахнино, Солтон, Хмелевка) и горную тайгу (Артыбаш, Средняя Шушь, Кузедеево).

Определение видов грызунов проводили на основе анализа рисунка жевательной поверхности зубов, краниальных, экстерьерных признаков и окраски шкурки [4].

Таблица 1.

Анализируемые изоляты *Echinococcus multilocularis*

Изолят	Территория	Генотип	Номер доступа в GenBank
Asian KZ	Казахстан	Азиатский	AB461415
Asian CN	Сычуань, Китай	Азиатский	AB461417
NA SL	о. Святого Лаврентия	Североамериканский	AB461418
NA US	Штат Индиана, США	Североамериканский	AB461419
Europe AU	Австрия	Европейский	AB461412.1
Europe SL	Словения	Европейский	AB461414.1
Europe FR	Франция	Европейский	AB461413
Mongolian	Внутренняя Монголия, Китай	Монгольский	AB461420

Исследование млекопитающих производили методом полных гельминтологических вскрытий. Для морфологических исследований извлеченных паразитов фиксировали в 70%-м спирте, а отдельные фрагменты метацестод для молекулярно-генетических исследований помещали в 96%-й этанол.

ДНК паразита экстрагировали с использованием набора “DNeasy blood and tissue Kit” (Qiagen) и использовали для полимеразной цепной реакции (ПЦР). Фрагменты мтДНК *cox1*, *cob*, *nd2* амплифицировали в ПЦР с использованием пар праймеров, представленных ранее [13]. Очистка продуктов ПЦР проводилась с помощью ExoSAP-IT (GE Healthcare). Секвенирование проводили с BigDye™ Terminator v3.1 в 3500 DNA sequencer (Applied Biosystems). Анализ полученных данных проводили с помощью программы “MEGA5” [19]. Полученные данные сравнивали с европейским, североамериканским и азиатским генотипами *E. multilocularis*, используя последовательности, представленные в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (табл. 1).

Построение сети гаплотипов осуществляли с помощью программы TSL v.1.21 [12]. Текстом обозначали соответствующие изоляты, пустой кружок обозначает отсутствующий (гипотетический) гаплотип.

Результаты

Из всех обследованных животных личиночные формы эхинококка были обнаружены только у 3 особей из 86 животных 10 видов, пойманных на территории Ново-

сибирской и Кемеровской областей (табл. 2.) У грызунов в Тюменской и Омской областях, в Алтайском и Красноярском краях, в Республике Алтай данный паразит нами не был зарегистрирован.

Личиночные формы *E. multilocularis* были выявлены у перезимовавших самок красной полевки и полевки-экономки в окрестностях с. Балахнино (Кемеровская обл.), отловленных в начале июня 2009 г., а также у половозрелой самки узкочерепной полевки, пойманной во второй половине августа 2010 г. в окрестностях города Карасук (Новосибирская область). Все самки принимали участие в размножении. Половозрелые формы цестод были обнаружены в кишечнике рыжей лисицы, добытой в окрестностях деревни Широкая Курья (табл. 3).

Анализ последовательностей гена *cox1* показал, что все исследуемые изоляты относятся к азиатскому генотипу *E. multilocularis*. Оба гаплотипа из Кемеровской области, гаплотип Rus-Nsk1 из Новосибирской области не отличались друг от друга. Гаплотипы Rus-Nsk1 и Rus-Nsk2 отличались друг от друга единичной заменой в 31-й позиции (Т > С). Полные данные с координатами замен представлены в таблице 4. В качестве главного гаплотипа указан китайский изолят (Asian CN).

Последовательности нуклеотидов исследуемых изолятов отличались от казахстанского и китайского гаплотипов по одной замене. Отличия от европейского гаплотипа (изолят из Австрии) – 8 замен нуклеотидов. От североамериканского гаплотипа (изоляты с о. Святого Лаврентия и штата Индиана)

Таблица 2.

**Количество млекопитающих, исследованных
в Новосибирской и Кемеровской областях, и выделенные изоляты *E. multilocularis***

Вид	Новосибирская обл.	Кемеровская обл.
Восточноазиатская мышь, <i>Apodemus peninsulae</i> Thom. 1907	–	6
Малая лесная мышь, <i>Apodemus uralensis</i> Pall. 1811	4	–
Мышь-малютка, <i>Micromys minutus</i> Pall. 1771	2	–
Джунгарский хомячок, <i>Phodopus sungorus</i> Pall. 1773	4	–
Барабинский хомячок, <i>Cricetulus barabensis</i> Pall. 1773	1	–
Рыжая полевка, <i>Myodes glareolus</i> Schreb. 1780	–	1
Красная полевка, <i>My. rutilus</i> Pall. 1779	1	5
Красно-серая полевка, <i>My. rufocanus</i> Sundev. 1846	–	6
Узкочерепная полевка, <i>Microtus gregalis</i> Pall. 1779	21	13
Полевка-экономка, <i>M. oeconomus</i> Pall. 1776	1	21
Рыжая лисица, <i>Vulpes vulpes</i> L., 1758	1	–
Всего	35	52

Таблица 3.

Оригинальные изоляты *Echinococcus multilocularis*

Изолят	Территория	Координаты	Вид хозяина
Rus-Kem1	Яшкинский район, Кемеровская область	55° 53' N, 85° 13' E	<i>Myodes rufocanus</i>
Rus-Kem2	Яшкинский район, Кемеровская область	55° 53' N, 85° 13' E	<i>Microtus oeconomus</i>
Rus-Nsk1	Карасукский район, Новосибирская обл.	53° 43' N, 77° 52' E	<i>Microtus gregalis</i>
Rus-Nsk2	Здвинский район, Новосибирская область	54° 34' N, 78° 08' E	<i>Vulpes vulpes</i>

изучаемые последовательности отличаются по 10–11 позициям. От гаплотипа из Внутренней Монголии (Китай) изучаемые последовательности отличны по 25–26 заменам.

Обсуждение

Исследования внутривидовых вариаций возбудителя альвеолярного эхинококкоза показали неоднородность его морфологических, биологических и генетических признаков. В составе *E. multilocularis* помимо типо-

вого подвида *E. multilocularis multilocularis*, описанного с территории Западной Европы, выделяют *E. multilocularis sibiricensis* Rausch, Schiller, 1954, описанный ранее как самостоятельный вид [18] от человека, грызунов, песцов и собак с острова Святого Лаврентия. Основываясь на данных (вероятно, ошибочных) о возможности заражения казахстанским изолятом овец, был выделен еще один подвид *E. multilocularis kazakhensis* Schulz, 1962. Позднее, изучая морфологические

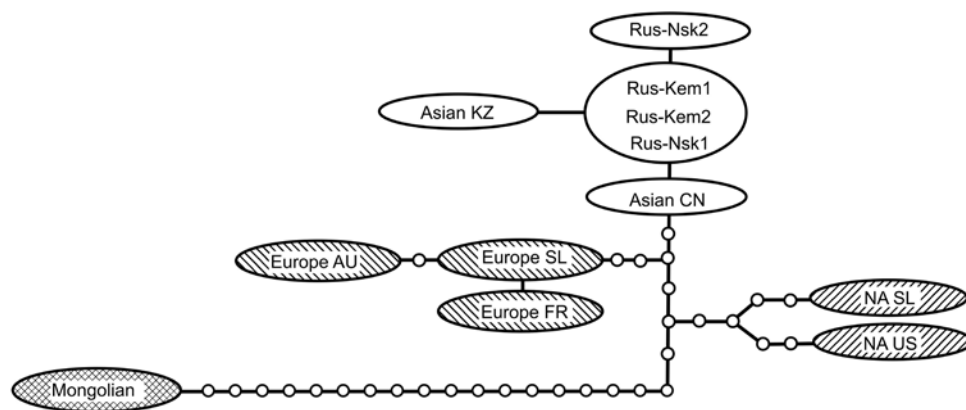
Рис. 1. Сеть гаплотипов *Echinococcus multilocularis*.

Таблица 4.

Различия последовательностей *cox1* гаплотипов *Echinococcus multilocularis*

Изолят	Позиция																			
	3 1	7 9	1 6 5	1 9	2 3 7	2 7 6	2 8 9	3 3 3	3 3 6	3 4 6	3 6 4	4 8 6	5 0 7	5 8 5	6 7 5	6 8 8	6 9 0	7 3 5	7 4 2	7 6 0
	Нуклеотид																			
Asian CN	T	A	T	A	T	G	T	A	A	T	G	T	G	G	T	C	A	T	C	A
Rus-Kem1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Rus-Kem2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Rus-Nsk1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Rus-Nsk2	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Asian KZ	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Europe AU	.	.	.	.	C	.	C	.	.	C	T	.	.	.	G	T	.	.	.	.
NA SL	.	.	.	.	.	.	C	.	G	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.
NA US	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	T	.	G	.	G
Mongolian	.	G	C	G	.	A	C	T	.	.	.	G	A	.	.	T	G	G	T	.

Изолят	Позиция																			
	7 9 5	8 0 0	8 2 2	9 2 6	1 0 5	1 1 0 7	1 1 5 2	1 2 1 5	1 2 4 9	1 2 9 3	1 3 1 4	1 3 2 9	1 3 5 1	1 3 8 9	1 3 9 8	1 4 3 4	1 4 8 8	1 5 0 9	1 5 4 8	1 5 7 3
	Нуклеотид																			
Asian CN	T	C	G	C	T	C	A	G	A	T	T	A	G	G	G	A	A	T	T	A
Rus-Kem1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.
Rus-Kem2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.
Rus-Nsk1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.
Rus-Nsk2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.
Asian KZ	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.
Europe AU	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NA SL	.	T	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	A	.	.	.	.	.	.	G
NA US	.	T	.	.	.	.	.	.	.	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	G
Mongolian	G	.	.	.	C	T	G	A	G	.	G	.	.	.	A	T	G	C	C	.

Примечание: «.» – совпадающие нуклеотиды, G, T, A, C – замены в соответствующих позициях.

и биологические особенности *E. multilocularis* с разных территорий, китайские исследователи [20, 21] описали новый вид *Echinococcus russicensis* Tang et al., 2006 с территории Внутренней Монголии (Китай). Название «русский» было дано на основе предположения, что основной его ареал находится на территории российского Забайкалья и Дальнего Востока. Несмотря на спорность некоторых таксономических действий, наличие внутривидовых различий, затрагивающих эпидемиологически важные свойства возбудителя альвеолярного эхинококкоза человека, не подвергается сомнению.

Исследования мтДНК представителей рода *Echinococcus* показали, что последовательности генов *cox1*, *nd2*, *cob* могут быть использованы для маркирования видовых и внутривидовых категорий [15]. Внутривидовая характеристика *E. multilocularis* была наиболее подробно изучена Накао с соавторами [16]. В составе вида различают четыре генотипа, по всей видимости, сохраняющих свою генетическую изолированность, благодаря приуроченности к разным окончательным хозяевам (песец, лисица, корсак) либо территориальной обособленности (центрально-европейский очаг). Каждый генотип представлен различными гаплотипами, выделяемыми на основании последовательностей мтДНК. Наибольшее разнообразие гаплотипов на данный момент известно для азиатского генотипа *E. Multilocularis*, имеющего самый большой ареал. Европейский генотип близок к азиатскому, что, возможно, связано с относительно недавней его изоляцией. Североамериканский и монгольский генотипы генетически дистанцированы от европейского и азиатского (рис. 1), что соответствует и их биологическим и морфологическим различиям.

Наши данные показали, что генетическая близость изолятов, выделенных на основе последовательностей мтДНК из Кемеровской, Новосибирской областей и Казахстана, позволяет предположить, что на данной территории имеется единый природный очаг альвеолярного эхинококкоза. Его разделение на отдельные очаги по административному или географическому призна-

кам искусственно. Само выделение очагов производилось по количеству случаев заболевания человека, что не совсем обосновано для природно-очагового заболевания. Эта территория является практически непрерывным ареалом азиатского генотипа цестоды *E. multilocularis*. Численность паразита в пределах ареала неоднородна и может зависеть от плотности промежуточных и окончательных хозяев.

При этом особи, имеющие разные гаплотипы, выделяемые на основании одной-двух замен пар нуклеотидов в последовательности гена *cox1*, по всей видимости, являются членами единой популяции. Для понимания общности или изолированности «якутского», «сибирского» и других выделяемых очагов или эндемичных районов, необходимо проведение крупномасштабных исследований генотипического разнообразия возбудителя альвеолярного эхинококкоза в Сибири.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты: 11-04-00870-а, 12-04-10171-к), а также Japan Society for the Promotion of Science (1256003, 24256002 to A. Ito).

Список литературы

1. Альперович, Б. И. Альвеококкоз и его лечение / Б. И. Альперович. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 1972. – 271 с.
2. Бессонов, А. С. Альвеолярный эхинококкоз и гистодоз / РАСХН. – М., 2003. – 334 с.
3. Быкова А. М. Гельминты хищных млекопитающих (Canidae, Felidae, Mustelidae) в Омской области и их эколого-фаунистический анализ // Автореферат на соиск. уч. степ. канд. биол. наук. Омск, 2007. – 26 с.
4. Громов, И. М. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Зайцеобразные и грызуны / И. М. Громов, М. А. Ербаева. – СПб., 1995.
5. Каденации, А. Н. К изучению эхинококкоза у лисиц и волков в Омской области / А. Н. Каденации. // Работы по гельминтологии: сб. работ по гельминтологии к 80-летию К. И. Скрябина. – М., 1959. – С. 72–75.
6. Лейкина, Е. С. К вопросу о природных очагах многокамерного эхинококкоза в Новосибирской области / Е. С. Лейкина, Н. П. Лукашенко, В. И. Зорихина, Б. К. Лавренов, М. М. Мамедов // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – М., 1959. – № 2. – С. 206–213.
7. Лукашенко, Н. М. К познанию природных очагов альвеококкоза (альвеолярного эхинококкоза) в Барабинской лесостепи / Н. М. Лукашенко // Тезисы докладов научной конференции всесоюзного общества гельминтологов. – М., 1960. – С. 76–77.
8. Лукашенко, Н. М. Эпидемиология альвеококкоза (альвеолярного эхинококкоза) в центральных

районах Барабинской лесостепи / Н. П. Лукашенко, В. И. Зорихина // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – М., 1961. – № 2. – С. 159–168.

9. Лукашенко, Н. П. Альвеококкоз / Н. П. Лукашенко. – М.: Медицина, 1975. – 328 с.

10. Никулина, Н. А. Генотипирование изолятов *Echinococcus granulosus* и *E. multilocularis* из разных регионов России / Н. А. Никулина, М. М. Гараев, И. М. Одолевская и др. // Материалы конференции «Теория и практика борьбы с паразитарными заболеваниями», под ред. Успенский А.В. – М.: Россельхозакадемия, 2003. – Вып. 4. – С. 285–287.

11. Шахматова, В. И. О природных очагах альвеококкоза в Сибири / В. И. Шахматова // Биологические проблемы природной очаговости болезней; под ред. Максимова А. А. – Новосибирск: Наука, 1981. – С. 123–134.

12. Clement, M. TCS: a computer program to estimate gene genealogies / M. Clement, D. Posada, K. A. Crandall // Molecular Ecology, 2000. – V. 9 (10). – P. 1657–1660.

13. Hüttner, M. Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* Ortlepp, 1937 (Cestoda: Taeniidae) from the African lion / M. Hüttner, M. Nakao, T. Wassermann, L. Siefert, J. D. F. Boomker, A. Dinkel et al. // International Journal of Parasitology, 2008. – Vol. 38. – P. 861–868.

14. Ito, A. Histopathological, serological, and molecular confirmation of indigenous alveolar echinococcosis cases in Mongolia / A. Ito, G. Agvaandaram, O. E. Bat-Ochir, B. Chuluunbaatar, N. Gonchigsenghe, T. Yanagida, Y. Sako, N. Myadagsuren, T. Dorjsuren, K. Nakaya, M. Nakao, Y. Ishikawa, A. Davaajav, N. Dulmaa // American Journal Tropical Medicine and Hygiene, 2010. – Vol. 82 (2). – P. 266–269.

15. Nakao, M. State-of-the-art *Echinococcus* and *Taenia*: Phylogenetic taxonomy of human-pathogenic

tapeworms and its application to molecular diagnosis / M. Nakao, T. Yanagida, M. Okamoto, J. Knapp, A. Nkouawa, Y. Sako, et al. // Infection, Genetic and Evolution, 2010. – Vol. 10. – P. 444–452.

16. Nakao, M. Geographic pattern of genetic variation in the fox tapeworm *Echinococcus multilocularis* / M. Nakao, N. Xiao, M. Okamoto, T. Yanagida, Y. Sako and A. Ito // Parasitology International, 2009. – Vol. 58 (4). – P. 384–389.

17. Rausch, R. On the ecology and distribution of *Echinococcus* spp. (Cestoda: Taeniidae), and characteristics of their development in the intermediate host / R. Rausch // Annales de Parasitologie Humaine et compare, 1967. – V. 42. – № 1. – P. 19–63.

18. Rausch, R. Studies on the helminth fauna of Alaska. XXIV. *Echinococcus sibiricensis* n. sp., from St. Lawrence Island / R. Rausch, E. L. Schiller // Journal Parasitology, 1954. – Vol. 40. – № 6. – P. 659–662.

19. Tamura, K. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods / K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar // Mol. Biol. Evol., 2011. – 28 (10). – P. 2731–2739.

20. Tang, C. T. Comparison observation on the mature alveolar of *Echinococcus sibiricensis* and *Echinococcus multilocularis* in the experimentally infected white mice / C. T. Tang, J. A. Chen, L. Tang, G. W. Cui, Y. C. Qian, Y. M. Kang, H. C. Lu // Shi Yan Sheng Wu Xue Bao, 2001. – Vol. 34 (4). – P. 261–268. [Article in Chinese].

21. Tang, C. T. Alveolar *Echinococcus* species from *Vulpes corsac* in Hulunbeier, Inner Mongolia, China, and differential development of the metacestodes in experimental rodents / C. T. Tang, Y. H. Wang, W. F. Peng, L. Tang, D. Chen // Journal of Parasitology, 2006. – Vol. 92 (4). – P. 719–724.



Ветеринарная клиника

Журнал «Ветеринарная клиника» — ежемесячное научно-практическое издание, в котором освещаются вопросы ветеринарной медицины мелких домашних и экзотических животных.

На страницах журнала публикуются:

- ✓ интервью с ведущими ветеринарными специалистами (рубрика «**ВЕТ-персона**»);
- ✓ статьи, освещающие вопросы лечения и профилактики заболеваний мелких домашних животных (рубрики «**Терапия**», «**Онкология**», «**Хирургия**», «**Стоматология**»);
- ✓ информация о новейших препаратах (рубрика «**Фармакология**»);
- ✓ информация о современных методах диагностики заболеваний (рубрика «**Диагностика**»).

Приглашаем к сотрудничеству авторов и рекламодателей.

По всем вопросам обращайтесь в редакцию по телефонам: (343) 214-76-30, 8-912-046-78-45.

Адрес редакции: 620142, г. Екатеринбург, ул. Белинского, 112а.

E-mail: vetklinika@uralbiovet.ru.

Уверенность в знаниях!



УДК 619.617.7:636.7(06)

Ключевые слова: перфорация роговицы, сквозная кератопластика, лиофилизированная донорская роговица
Key words: corneal perforation, penetrating keratoplasty, freeze-dried donor cornea

Павлова Т. Н.

СКВОЗНАЯ И ПОСЛОЙНАЯ КЕРАТОПЛАСТИКА С ПРИМЕНЕНИЕМ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО ДОНОРСКОГО ТРАНСПЛАНТАТА У МЕЛКИХ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ *PENETRATING AND LAMELLAR KERATOPLASTY WITH APPLICATION OF A FREEZE-DRIED DONOR GRAFT AT SMALL DOMESTIC ANIMALS*

ФГУ ВПО «Московский Государственный Университет Пищевых Производств»

Адрес: 109316, Москва, ул. Талалихина, 33

Moscow State University of Food Manufactures.

Address: 109316, Russia, Moscow, Talalikhin street, 33

Павлова Татьяна Николаевна, аспирант / *Pavlova Tatiana N., Postgraduate*

Аннотация. В статье рассмотрено применение лиофилизированной донорской роговицы при сквозной и послойной кератопластике у мелких домашних животных при различных поражениях роговицы.

Summary. *The article describes the application of a freeze-dried donor cornea in penetrating and lamellar keratoplasty at small domestic animals with various corneal lesions.*

Введение

Повреждения и заболевания роговицы занимают одно из ведущих мест в ветеринарной офтальмологии. В таких экстренных ситуациях, как проникающие ранения глаза с дефицитом ткани роговицы, ожоги глазного яблока, язвы роговицы, осложненные десцеметоцеле и перфорации ее при инфекционных, трофических, аллергических и других кератитах, необходимо urgentное хирургическое вмешательство на роговой оболочке [1]. Основной целью лечебной кератопластики (ЛКП) является сохранение глазного яблока путем удаления патологического участка роговицы и замещения ее дефекта. Ранее с целью коррекции дефектов роговицы нами применялись различные материалы: конъюнктивальный лоскут «на ножке», аллоплант проф. Мулдашева (г. Уфа), биотрансплантат компании «Cook» (Австралия) [4, 5, 6, 7]. Все они имеют как выраженные достоинства, так и существенные недостатки.

Целью нашей работы являлся внедрение материала, наиболее полно отвечающего следующим требованиям:

- 1) возможностью применения при сквозной и послойной кератопластике;
- 2) высокой степенью приживляемости;

3) доступностью и простотой методов использования.

Наиболее полно этим требованиям отвечает донорская роговица. Следует отметить, что роговица является исключением среди других тканей, подлежащих трансплантации. Она не имеет собственных сосудов и отделена от сосудистого тракта глаза, чем и объясняется относительная иммунная обособленность роговицы, позволяющая успешно выполнять кератопластику без строгого подбора донора и реципиента.

Задачами нашей работы было:

- 1) подобрать наиболее доступный способ консервации донорской роговицы для собак и кошек;
- 2) разработать технические этапы сквозной и послойной кератопластики;
- 3) оценить результаты хирургического лечения, интра- и послеоперационные осложнения.

В ветеринарной офтальмологии на базе «Центра ветеринарной офтальмологии доктора Шилкина А. Г.» г. Москвы мы впервые стали использовать консервированный донорский материал для трансплантации. В нашей стране на сегодняшний день не разработаны и не описаны сведения о показаниях, технике операции, клинических резуль-

татах и характере осложнений при данном методе, в связи с чем и было проведено данное исследование.

Материалы и методы

Донорский материал мы получали от животных (кошки, собаки) павших вследствие травм или усыпленных по желанию владельца. У животных – доноров материала отсутствовали клинические проявления инфекционных, онкологических и системных заболеваний. Мы выбрали наиболее доступный для практического использования метод обезвоживания донорских тканей в присутствии силикагеля на основе двуокиси кремния. Данный метод консервации обладает относительной простотой и доступностью и, что самое главное, позволяет хранить консервированный материал длительное время (до 6 месяцев). К сожалению, недостатком этого метода является гибель эндотелиального слоя роговицы в процессе высушивания, что снижает оптическую прозрачность трансплантата при выполнении сквозных пересадок [8].

За 2 года нами было прооперировано 45 животных, из них 35 собак (2 собаки с бинокулярной патологией) и 10 кошек (1 кошка с бинокулярной патологией), в возрасте от 3 месяцев до 10 лет. Показаниями к трансплантации донорской роговицы послужили: 1) перфорирующие и не перфорирующие септические язвы роговицы; 2) скальпированные травмы с потерей более 50 % роговицы; 3) тотальные и субтотальные корнеальные секвестры с поражением всех слоев роговицы, включая эндотелий.

Техника операции зависела от глубины и тяжести поражения роговицы. При глубоких язвах и десцеметоцеле проводили послойную кератопластику, при перфорациях роговицы – сквозную кератопластику. Основные моменты операции сквозной кератопластики осуществлялись по общепринятой медицинской методике, описанной Дроновым М. М. (1997 г.) [2, 3] и адаптированной для использования в ветеринарной офтальмологии мелких домашних животных Шилкиным А. Г. в 2004 году [10].

Операция проводилась под общей анестезией со стандартной обработкой операци-

онного поля. Для расширения глазной щели латеральную кантотомию не проводили, использовали векорасширитель. Наилучшие результаты наблюдали при применении векорасширителя McNeill-Oldman, который выполнял функции как расширителя, так и фиксатора глазного яблока. Акинезии глазного яблока достигали также путем наложения на конъюнктиву фиксирующих лигатур. Лиюфилизированную донорскую роговицу регидратировали в растворе 1%-го гентамицина и 0,9%-м физиологическом растворе в соотношении 1 : 5, сроком до 30 минут. Планируемую зону трансплантации ограничивали трепаном. Трепан подбирали таким образом, чтобы охватить всю область пораженных тканей. Далее некротизированные ткани роговицы иссекали алмазным микролезвием и лейкосапфировым ножом-расслаивателем с применением техники суперфициальной кератэктомии. В случае остаточной инфильтрации поэтапно удаляли более глубокие ее слои [10]. При проведении сквозной кератопластики при необходимости дополнительно проводили рассечение синехий, освобождали зрачковую диафрагму, удаляли гнойно-фибринозные сгустки из передней камеры. Из донорской роговицы трепаном соответствующего диаметра на специальной стерильной подложке из медицинского каучука выкраивали трансплантат. Такая техника позволяет добиться точного соприкосновения собственной роговицы с донорским трансплантатом. В некоторых случаях, когда был необходим трансплантат нестандартной формы, для его выкраивания использовали алмазный микронож и микрохирургические ножницы. Для фиксации применяли одиночные, узловатые, роговичные швы, использовали шовный материал Prolen 8/0, 9/0. Иглу проводили на расстоянии 1 мм от краев раны, через толщу роговицы, не захватывая внутренний эндотелиальный слой. Вначале накладывали швы в позиции на «12-3-6-9 часах». После фиксации трансплантата швы накладывали с интервалом 1–1,5 мм в соответствующие меридианы роговицы. Операцию заканчивали субконъюнктивальным введением гентамицина 1 %. [9]. В течение 4 недель животные находились в защитных



Рис. 1. Послойная кератопластика.



Рис. 2. Субтотальная сквозная кератопластика.

воротниках. Послеоперационный уход включал системное и местное применение антимикробных средств, инстилляций НПВС, кератопротекторов и мидриатиков. Роговичные швы снимали через 21–35 дней.

Результаты исследований

Результаты исследований показали сохранение прозрачности в области дефекта у 20 % животных с небольшим диаметром трансплантата (менее 8 мм) при передней послойной кератопластике. Помутнение трансплантата различной степени интенсивности мы наблюдали у 80 % животных после проведения сквозных кератопластик, носящих органосохраняющий характер.

Общее количество осложнений, включающие интраоперационные и послеоперационные при сроке наблюдения до двух лет, в проведенных нами клинических исследованиях составило 15 %. Интраоперационные перфорации десцеметоцеле ($n = 2-4$ %) корректировались сопоставлением краев дефекта десцеметовой мембраны с последующей фиксацией донорской роговицы или проведением сквозной кератопластики в условиях гипотонии. Постоперационные осложнения ($n = 5-11$ %): «болезнь трансплантата» (отмечалась с 7-го дня) являлась следствием ответа иммунной системы организма на чужеродную ткань. Проявлялось данное осложнение стойкой и интенсивной гиперемией конъюнктивы, помутнением донорской роговицы, дислокацией и отеком трансплантата, отторжения швов при сквозных кератопластиках (собаки $n = 3-7$ %). Постоперационный паноптальмит наблюдали на 10 день (кошка $n = 1-2$ %), образование вторичной глаукомы после 21 дня от операции (собака

$n = 1-2$ %). Большое количество осложнений можно объяснить тяжестью патологии, отсутствием данных по иммунологической совместимости лиофилизированной роговицы у животных, поздними сроками обращения владельцев животных за специализированной помощью. За последний год мы отметили снижение количества послеоперационных осложнений трансплантации донорской роговицы на 5 %.

Анализ результатов

После проведенных операций у 85 % животных удалось сохранить глаз как орган (рис. 2). У 20 % животных удалось сохранить не только глаз, но и его частично оптические функции (рис. 1). Из недостатков метода можно отметить встречающееся непрозрачное приживание донорской роговицы.

Выводы

Лиофилизированный донорский трансплантат целесообразно применять при сквозной и передней послойной кератопластике. Его эффективно использовать при замещении дефектов любой величины вплоть до тотальных. Мы отметили высокую степень приживляемости и значительную межпородную совместимость лиофилизированного донорского трансплантата. Простота и доступность получения донорской лиофилизированной роговицы позволяет рекомендовать ее использование в практике ветеринарной офтальмологии.

Список литературы

1. Гольфельд, Н. Г. Послойная пересадка обезвоженной роговицы с укреплением трансплантата клеем / Н. Г. Гольфельд. – М. : Медицина, 1976. – 119 с.

2. Дронов, М. М. Руководство по кератопластике / М. М. Дронов. – СПб. : Влазипресс, 1997. – 130 с.
3. Дронов, М. М. О роговичных трансплантатах / М. М. Дронов // Офтальмохирургия и терапия. – 1/2002. – Т. 2. – С. 2.
4. Кадыров, Р. З. Регенерация роговицы после послойной кератопластики с применением биоматериала аллоплант / Р. З. Кадыров // Вестник ОГУ. – № 78, дек. 2007. – С. 94.
5. Канюков, В. Н. Тектоническая кератопластика альтернативным донорским материалом / В. Н. Канюков, Е. Ф. Чеснокова // Вестник ОГУ. – Дек. 2004. – С. 88.
6. Мулдашев, Э. Р. Аллопланты для офтальмологии / Э. Р. Мулдашев, С. Муслимов, Саликов. – Уфа, 1987. – С. 30.
7. Мурзабекова, Ф. А. Сравнительные результаты лечения язв роговицы различными способами

кератопластики / Ф. А. Мурзабекова // ГОУ ВПО РГМУ РосЗдрава, МОКБ, Вестник ОГУ. – № 12, дек. 2006. – С. 119.

8. Подопригора, Р. Н. Методы консервации донорского материала / Р. Н. Подопригора // Вестник ОГУ. – Дек. 2004. – С. 100.

9. Степанов, В. К. Особенности техники выполнения лечебной пересадки роговицы при гнойных кератитах / В. К. Степанов // Вестник ОГУ. – Дек. 2004. – 107.

10. Шилкин, А. Г. Техника и результаты послойной пересадки роговицы с использованием искусственных трансплантатов у собак и кошек / А. Г. Шилкин, Е. П. Копенкин, М. А. Аверин, В. В. Олейник // Материалы к 12-му Международному конгрессу по болезням мелких домашних животных, 2004. – С. 153.

АППАРАТ ДЛЯ ИМПУЛЬСНОЙ БИОСИНХРОНИЗИРОВАННОЙ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОЙ ТЕРАПИИ «УМИ-05»

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

Основные направления применения «УМИ-05»

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



Стандартный курс лечения

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

Экономика

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

Стоимость прибора 19 500 руб. Заказать УМИ-05 можно по тел./факсу: (812) 927-55-92; по e-mail: virclin@mail.ru. Подробности на сайте: www.invetbio.spb.ru

УДК 574.2:639.247.453

Ключевые слова: реабилитация, кольчатая нерпа, серый тюлень

Key words: rehabilitation, ringed seal, grey seal

Алексеев В. А., Андриевская Е. М., Труханова И. С.

МЕТОДИКА РЕАБИЛИТАЦИИ ЩЕНКОВ СЕРОГО ТЮЛЕНЯ И КОЛЬЧАТОЙ НЕРПЫ

RINGED SEAL AND GREY SEAL PUP REHABILITATION METHODOLOGY

¹НП «Центр реабилитации морских млекопитающих Ленинградской области»

Адрес: 194156, Санкт-Петербург, ул. Сердобольская, д. 2В, лит. А, оф. 4-Н

¹*Marine Mammal Rehabilitation Centre of Leningrad Region*

Address: 194156, Russia, Saint-Petersburg, Serdobolskaya street, 2B, liter A, office 4-H

²СПбБОО «Биологи за охрану природы»

Адрес: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9-11

²*SPbCPO Biologists for Nature Conservation*

Address: 199034, Russia, Saint-Petersburg, Universitetskaya nab., 7/9-11

Алексеев Вячеслав Анатольевич, ген. директор¹ / *Alekseev Vyacheslav A., Director General¹*

Андриевская Елена Михайловна, ведущий специалист¹ / *Andrievskaya Elena M., Leading Specialist¹*

Труханова Ирина Сергеевна, координатор проектов² / *Trukhanova Irina S., Project Coordinator²*

Аннотация. В 2009 году нашим коллективом была разработана «Методика реабилитации щенков серого тюленя и кольчатой нерпы». Данная работа является первым в России специализированным трудом по данной тематике. Создавая данную методику, мы опирались на собственный опыт, полученный в 2007–2009 годах при организации нами службы спасения для морских млекопитающих Ленинградской области и на опыт аналогичных зарубежных служб. В методике отражены следующие аспекты работ по реабилитации: общебиологические данные; методы работы с населением; порядок действий при обнаружении животного; способы кормления; критерии и условия выпуска. На основе этой методики нам впервые в России удалось оказать помощь и вернуть в естественную среду обитания 8 серых тюленей, 2 балтийские и 4 ладожские кольчатые нерпы.

Summary. In 2009 we developed the “Ringed Seal and Grey Seal Pup Rehabilitation Methodology”. This methodology is the first specialized work in this sphere in the Russian Federation. Work on the Methodology was based on our own experience gained in 2007–2009 due to organization of marine mammal rescuing service in Leningrad region and on the experience of our foreign colleagues. In the Methodology we highlighted the following issues related to rehabilitation process: general biology data, ways of working with local population, operation procedure in the event that an animal is found, feeding methods, criteria and procedure of its release. Basing on this Methodology we have pioneered in rescuing 8 grey seals, 2 Baltic and 4 Ladoga ringed seals and releasing them in the natural habitat.

Введение

На территории Ленинградской области обитают два вида ластоногих: серый тюлень *Halichoerus grypus macrorhynchus* (Hornschuch and Schilling, 1851), балтийская *Pusa hispida botnica* (Gmelin, 1788) и ладожская *Pusa hispida ladogensis* (Nordquist, 1899) кольчатая нерпа. Оба вида внесены в Красную книгу РФ, Красный список МСОП и ряд региональных Красных книг [3, 7]. Динамика численности балтийской и ладожской кольчатой нерпы поистине катастрофична. В начале XX века локальная популяция балтийской нерпы Финского залива состояла из 50–70 тыс. особей [6], в 1982 году – 3,5–4 тыс. особей [4], а в 2005 году составила уже не более 200 животных. Численность

ладожской кольчатой нерпы сократилась с 20 тыс. в начале прошлого столетия [5] до 3–5 тыс. в начале нынешнего [2]. Популяция серого тюленя не вызывает большой обеспокоенности ученых балтийского региона, однако в российской части Финского залива не наблюдается тенденции к приросту его численности, которая после резкого снижения в конце 80-х восстановилась в наших водах лишь до 500–600 особей [1]. При этом можно отметить постоянно возрастающую антропогенную нагрузку на места обитания морских млекопитающих. Учитывая эти факторы, можно прогнозировать негативные изменения в состоянии популяций ластоногих на северо-западе России. В качестве одной из мер, способствующих восстановле-

нию численности кольчатой нерпы и серого тюленя в Финском заливе и на Ладожском озере, мы предлагаем осуществлять работу по реабилитации молодняка ластоногих. Основная направленность реабилитационных мероприятий – оказание помощи детенышам нерпы и серого тюленя при преждевременном отрыве от самки в период выкармливания, а также в первые месяцы после начала самостоятельной жизни.

До 2007 года в России не проводились широкомасштабные работы по реабилитации ластоногих, в связи с чем наблюдается отсутствие информации по данному вопросу. Разработанные нами методические указания смогут помочь в проведении работ по реабилитации серого тюленя и кольчатой нерпы. Создавая данную методику, мы опирались на собственный опыт, полученный в 2007–2009 гг. при организации нами службы спасения для морских млекопитающих Ленинградской области, и на опыт аналогичных зарубежных служб. Всего нами было реабилитировано и выпущено в естественную среду обитания 8 серых тюленей, 2 балтийские и 4 ладожские кольчатые нерпы.

1. Общебиологические данные

Pusa hispida botnica (Gmelin, 1788) обитает в Балтийском море. Средний вес взрослого животного составляет от 50 до 110 кг для самок и до 125 для самцов. Щенка происходит в феврале-марте. Щенки рождаются с весом 3,3–4,6 кг, эмбриональный покров начинает сходить в возрасте 2 недель и заканчивает к 6 неделям. К моменту окончания молочного кормления, на 5–6 неделе жизни, щенки увеличиваются до 19–22,5 кг. Молоко самки содержит 45–55 % жира, что позволяет щенку быстро накопить существенный запас жира. В полугодовалом возрасте вес животного составляет 34–37 кг.

Pusa hispida ladogensis (Nordquist, 1899) – эндемичный пресноводный подвид кольчатой нерпы, обитающий в Ладожском озере. Взрослая ладожская нерпа весит 60–70 кг. По другим данным средний вес составляет 40–50 кг, а максимальный – 98 кг. Щенки рождаются с весом 4–5 кг. Лактация длится 1,5–2 месяца. Точных данных по привесу

щенков ладожского подвида в литературе не найдено, однако, согласно мнению некоторых специалистов, на момент окончания лактации щенок весит около 15 кг.

Halichoerus grypus macrorhynchus (Hornschuch and Schilling, 1851) – балтийский подвид серого тюленя, основным отличием которого от атлантического подвида является его пагофильность. Пик щенки приходится на конец февраля – первую половину марта. Длина тела взрослых особей 170–250 см. Вес у взрослых особей того и другого пола варьирует от 130 до 320 кг. При рождении щенки в норме весит около 15 кг, лактация длится около двух недель. За это время щенки ежедневно прибавляют в весе примерно 2 кг. Жирность материнского молока в период кормления постепенно возрастает от 35 до 60 %. Средняя масса тела щенка на момент окончания лактации оценивается в 37,8 кг для самок и 40,2 для самцов, нередко щенки за период молочного кормления набирают до 47–50 кг. Бельковый покров начинает сходить на вторую неделю жизни и обычно полностью сменяется к месячному возрасту.

2. Оповещение населения

Перед сезоном размножения животных проводится оповещение населения, местных администраций и региональных спасательных служб о порядке действий в случае обнаружения животных. Оповещение проводится путем раздачи памяток, бесед и работы со средствами массовой информации. Примерный текст памятки приводится:

Внимание!

В Финском заливе на территории Ленинградской области обитают два вида ластоногих: серый тюлень и балтийская кольчатая нерпа. Оба вида внесены в Красную книгу РФ.

Кольчатая нерпа и серый тюлень размножаются на льду в начале весны. Из-за аномально теплой зимы 2008 года велика вероятность преждевременного попадания детенышей в воду и отрыв от самок. Большинство тюленят погибнет.

При обнаружении на побережье детенышей тюленей просим Вас незамедлительно

сообщить об этом по телефонам: (номера телефонов).

Если Вы заметили детеныша тюленя, то:

1. Не обнаруживайте своего присутствия и не пугайте животное.

2. Сообщите о Вашей находке сотрудникам реабилитационного центра или МЧС.

3. В случае необходимости (видны открытые раны, животное сильно истощено, неестественное положение конечностей) ограничьте доступ животного к открытой воде, предприняв меры для защиты тюленят от бродячих собак и птиц.

4. Дождитесь приезда спасателей.

5. Не пытайтесь самостоятельно выкармливать детенышей и оказывать ветеринарную помощь.

После оказания помощи животные будут выпущены в природу.

Просим Вас сообщать также обо всех случаях обнаружения мертвых тюленей по указанным телефонам: (номера телефонов).

3. Порядок действий при обнаружении животного

После поступления вызова устанавливается связь с контактными лицами в Росприроднадзоре, сообщаются обстоятельства обнаружения животного и принимается согласованное решение о необходимости выезда для оказания помощи. На реабилитацию должны приниматься животные истощенные, травмированные, поврежденные сетями, загрязненные нефтепродуктами или иными техническими жидкостями, незаконно содержащиеся у граждан и организаций, преждевременно (до окончания срока выкармливания) оторвавшиеся от самок детеныши, а также животные, находящиеся на территории населенных пунктов. Дополнительной проработки требуют ситуации, в которых животное может быть изъято в качестве предупредительной меры без непосредственной угрозы жизни на момент изъятия (например, из-за неблагоприятно складывающейся ледовой обстановки). При возможности помощь животному может быть оказана на месте с последующим немедленным выпуском. По прибытии на место посредством фото-, видеооборудования

фиксируется первоначальное состояние животного и окружающая обстановка. С гражданами, обнаружившими тюленя, а также с присутствующими на месте должностными лицами составляется акт, где фиксируются состояние животного на момент обнаружения и обстоятельства, при которых было найдено животное. Оценивается состояние животного на предмет пригодности к транспортировке.

Транспортировка и размещение

Перед перевозкой с места обнаружения животным необходимо произвести вливание солевых растворов (Regidron или его аналоги) для снятия синдрома обезвоживания. Если животное испытывает сильный стресс, можно также использовать препарат Дексаметазон (Dexametazon) внутримышечно 0,5 мл / 10 кг веса.

Животное должно быть максимально быстро доставлено к месту оказания помощи. При перевозке нужно постоянно следить за температурой, дыханием и общим состоянием зверя.

Перевозка осуществляется в транспортной клетке достаточного размера (не менее 0,9 × 0,6 × 0,6 м). В качестве подстилки можно использовать чистые полотенца. Во избежание перегрева животного транспорт, использующийся для перевозки, должен хорошо проветриваться (без сквозняков) или иметь систему кондиционирования. Температура в салоне не должна превышать +15 градусов Цельсия. При перегреве животного используются охлаждающие пакеты или лед. При гипотермии животное укрывается теплоизолирующим медицинским покрывалом или полотенцем.

Первая помощь

После прибытия животного к месту оказания помощи оно помещается в изолированный бокс размером не менее 1,5 × 1,5 м для кольчатых нерп и 1,5 × 2,0 м для серого тюленя. Бокс должен быть оборудован полом из легко моющегося материала. Для истощенных животных необходим обогрев (инфракрасные лампы типа ИКЗК или аналогичные). Лампы устанавливаются таким образом, чтобы в боксе имелся необогреваемый участок, предоставляющий

животному возможность самостоятельной терморегуляции.

В случае сильного истощения животного, травм, ограничивающих подвижность, или после длительного нахождения в воде без возможности выбраться на сушу животное может быть помещено в помещение с комнатной температурой либо с температурой, повышенной по отношению к уличной. В остальных случаях оно должно содержаться при уличной температуре для предупреждения преждевременной линьки и терморегуляции у бельков.

Регистрация состояния животного

После поступления животного в стационар оно должно быть максимально полно обследовано клинически. Исследуется температура тела, целостность опорно-двигательного аппарата, наличие травм, нарушений целостности покровов кожи, наличие пятен нефти и технических жидкостей и др. На каждое животное заводится журнал наблюдений, ведется история болезни.

Температура тела

Нормальная температура тела щенка серого тюленя и кольчатой нерпы должна быть около $37 \pm 0,5$ градуса Цельсия. Температура может быть немного ниже, например после мочеиспускания, если животное намочило от мочи. В этом случае температура тела может понизиться до 35 градусов Цельсия. Бельки не имеют достаточной жировой прослойки, поэтому температура их тела весьма нестабильна. Для измерения температуры кончик термометра смазывается вазелином и вставляется в анальное отверстие (самец тюленя имеет только одно отверстие под хвостом; самка – два, анальное отверстие – верхнее).

Если температура тела щенка менее 35,5 градусов Цельсия, его необходимо положить на одну или две бутылки с теплой водой, обернутые полотенцем. Поглаживание задних конечностей руками будет способствовать улучшению циркуляции крови тюленя и повышению температуры тела.

Если температура тела щенка более 37,8 градусов Цельсия, для понижения температуры белька необходимо поместить его в прохладное помещение и поливать задние лапы холодной водой. Температура в таком

случае измеряется каждые 15 минут. Нет необходимости поливать водой всего белька, т. к. белый мех хорошо впитывает влагу и плохо высыхает. Нельзя накрывать задние лапы мокрым полотенцем – это дает обратный эффект. Необходимо избегать слишком больших перепадов температуры. После снижения температуры до 37,5 градусов Цельсия нужно прекратить охлаждение!

Опасная для жизни температура тела – 39 градусов Цельсия и выше.

Осмотр полости рта щенка

При осмотре полости рта учитывается наличие воспалительных процессов, ран, отсутствие зубов, наличие инородных тел, крови и т. д. По цвету слизистых оболочек полости рта также можно получить предварительные сведения о физическом состоянии (розовый – норма; красный – возможно, высокая температура; бледный – возможно, низкая температура; голубой – проблемы с дыханием, недостаток кислорода).

Аускультацией выявляются посторонние хрипы и шумы в области легких, дыхательных путей, кишечника. Проверяется работа сердца. Пальпацией выясняется наличие скрытых переломов, ушибов и иных повреждений.

Определение длины тела и веса животного

Длина тела животного измеряется от кончика носа до кончика хвоста по спинной стороне, также измеряется максимальный обхват груди.

Взвешивание животного производится в транспортной клетке с последующим вычетом массы пустой клетки. Допускается взвешивание животного на руках человека при помощи напольных весов.

Исследуются каловые массы и моча животного. При этом выявляется: количество, консистенция, запах, наличие видимых посторонних включений, крови или паразитов.

При необходимости применяются иные инструментальные или лабораторные исследования. Целесообразно проведение клинического и биохимического анализа крови, а также исследование кала на наличие яиц гельминтов и патогенной микрофлоры.

В случае выявления болезней назначается лечение.

Наиболее часто встречающаяся и опасная болезнь при попадании тюленей в реабилитационные центры – пневмония, возникшая в результате переохлаждения или в результате инфекционного поражения.

Лечение пневмонии (примерная схема из расчета на животное весом в 20 кг)

1. Антибиотики.
Цефтриаксон – внутримышечно – 0,5 г, растворенных в 4 мл воды для инъекции – 2 раза в день по 2 мл, не менее 5 дней.
2. Иммуностимуляторы.
Циклоферон – внутримышечно – 1 мл – через день.
3. Препараты, поддерживающие сердечную деятельность.
Сульфокамфокаин – внутримышечно – 1 мл – 1 раз в день.
4. Мочегонные препараты.
Лазикс – внутримышечно – 1 мл – 2 раза в день.
5. Препараты, восполняющие дефицит калия и магния.
Аспаркам – 0,5 таб. – 1 раз в день.
6. Препараты, улучшающие внутритканевой обмен веществ.
Кокарбоксилаза – внутримышечно – 1 мл – 2 раза в день.

Дегельминтизация

Дегельминтизация проводится по следующей схеме: 1 день – Praziquantal – 50 мг / 10 кг; 2, 3, 4 день – Ranacur – 11 мг / 1 кг.

4. Кормление

Методика кормления с использованием опыта Alaska Sea Life Center (USA), Irish Seal Sanctuary (UK) и НП «Центр реабилитации морских млекопитающих Ленинградской области» (Россия)

Первоочередной задачей является снятие обезвоживания и восстановление электролитного баланса. Для этого животному при помощи зонда вводится раствор регидрона 10–15 % от массы тела, и в первые сутки данная процедура повторяется каждые 3–4 часа. Регидрон (Regidron) применяется в виде раствора: 1 уп. / 1 л кипяченой воды. Состав 1 упаковки: натрия хлорид – 3,5 г, натрия цитрат – 2,9 г, калия хлорид – 2,5 г, глюкоза – 10 г.

Техника постановки зонда

В качестве зонда для выкармливания детенышей используется мягкая пластиковая трубка диаметром 10 мм (для кольчатой нерпы) или 15–20 мм (для серых тюленей) с прикрепленной к ней воронкой. Перед использованием зонд стерилизуется в горячей воде и смазывается маслом.

Животное укладывается животом на ровную поверхность, голова укрывается полотенцем.

Сотрудник, осуществляющий кормление, размещается над животным в области лопаток, прижимая коленями передние лапы тюленя к его туловищу. Корпусом человек фиксирует детеныша к земле, оставляя свободным пояс задних конечностей.

Зонд закладывается в угол рта, затем медленно и плавно проталкивается в пищевод. Если это делается достаточно осторожно, то зонд автоматически попадет в правильное положение. Если он продвигается с трудом, то необходимо повторить ввод зонда сначала (чтобы не попасть в легкие). Если все делается правильно, то тюлень начинает заглатывать зонд. У некоторых животных можно видеть подкожный бугорок, образуемый кончиком зонда и движущийся в области пищевода. Ввод зонда продолжается до появления в воронке характерных «хрюкающих» звуков, свидетельствующих о попадании зонда в желудок. После этого трубка пережимается, а воронка заполняется жидкостью или смесью (см. ниже).

После кормления зонд зажимается и в зажатом состоянии вынимается из рта тюленя.

Организация кормления тюленей

В большинстве центров реабилитации морских млекопитающих используется способ выкармливания тюленят с применением смеси на основе рыбного фарша с последующим переводом на цельную рыбу. Одно из наиболее важных условий успешной реабилитации – правильно организованная работа по кормлению животных. Необходимо обеспечить использование для кормления и приготовления кормовой смеси только качественную рыбу, хранившуюся в надлежащих условиях.

Условия хранения рыбы

- Базовое хранение – на складе, температура хранения от -20 до -32 °С.
- Хранение корма в центре на протяжении 1–3 месяцев, температура -18 °С.
- Хранение рыбы при температуре от -5 до -10 °С допускается в течение 2–3 дней, а при температуре от 0 до -0,5 °С – в течение 1,5 часов.

Разморозка и определение качества рыбы

Правильная разморозка рыбы имеет большое значение для ее качества. Неправильная разморозка приводит к потере питательных веществ, окислению липидов, развитию бактерий и потере вкусовых качеств. Вся рыба должна быть скормлена животным в течение 24 часов с момента начала разморозки.

Наиболее предпочтительный способ размораживания рыбы – размораживание в прохладном помещении. При разморозке рыбных блоков удаляется внешняя первая талая рыба для ускорения оттаивания внутренней части блока. Отделение рыб друг от друга следует производить осторожно, чтобы не нарушить цельность рыбы.

Другой метод заключается в размораживании рыбы под проточной питьевой водой при температуре менее +20 °С. Размораживание в стоячей воде не допускается.

Все оборудование, используемое при приготовлении рыбы, должно быть промыто горячей водой (около 90 °С) и продезинфицировано после каждого кормления.

Качество рыбы

Рыба должна иметь блестящую плотно прилегающую чешую и гладкую упругую кожу, выпуклые или слегка запавшие глаза с прозрачной роговицей, ярко-розовые или бледно-красные жабры, плотно закрытые жаберной крышкой. Рыба должна быть плотной и твердой, не иметь вздутого брюшка, вмятин, порезов и неприятного запаха. Если рыба не обладает всеми этими качествами, она не может использоваться для кормления морских млекопитающих (табл.1).

Использование витаминно-минеральных комплексов

При проведении работ по реабилитации детенышей ластоногих целесообразно ис-

пользовать витаминно-минеральные комплексы, разработанные специально для морских млекопитающих: “SEA TABS® for Larger Marine Animals (Cetaceans, Pinnipeds, etc.)” или Mazuri®, Purina Mills, Inc., St. Louis, MO (табл. 2, 3 и 4).

С 3-го кормления животного может использоваться два типа кормовой смеси на основе рыбного фарша (таблица 5).

Из филе сельди необходимо приготовить фарш и смешать с остальными компонентами, доведя до однородной консистенции в блендере. Перед кормлением необходимо нагреть смесь до 20–25 градусов, а между кормлениями хранить ее в холодильнике, но не более 24 часов. Схема кормления приведена в таблице 6.

Перевод тюленей на цельную рыбу

На второй день нахождения животного в стационаре перед каждым кормлением смесью тюленю предлагается рыба. Рыбу бросают в бассейн (ванну), наполненный водой за 30 минут до кормления, при помощи водяной струи осуществляется перемещение рыбы по бассейну (ванне). Если в течение нескольких дней животное не проявляет интереса к предложенной рыбе или не съедает положенной нормы в 15–20 % от массы тела, то начинается этап принудительного кормления. Для кормления серых тюленей используется сельдь зимнего вылова с массой 150–250 г. Для кормления кольчатых нерп используется балтийская салака. Перевод со смеси на цельную рыбу производится постепенно в течение 2–3 дней, при этом количество смеси постепенно уменьшается, а количество рыбы увеличивается. Число кормлений в день сокращается с 5–6 до 4 кормлений с интервалом в 4 часа. При этом животному по-прежнему предлагается рыба в воде для самостоятельного поедания. При наличии возможности приветствуется использование живой рыбы.

Техника принудительного кормления рыбой

Животное укладывается животом на ровную поверхность, голова укрывается полотенцем.

Сотрудник, осуществляющий кормление, размещается над животным в области лопаток, прижимая коленями передние лапы тю-

Таблица 1.**Пищевая ценность используемых видов рыб**

	вода	белок	жир	ккал/кг
Сельдь атлантическая зимняя	61,3	17,7	19,5	2460
Сельдь атлантическая летняя	72,2	19,1	6,5	1350
Салака весенне-летняя	78,2	17,5	3,0	970
Салака осенне-зимняя	73,4	17,0	8,3	1430

Таблица 2.**Суточная потребность морских млекопитающих в витаминах**

Витамин	Суточная потребность на 10 кг веса/мг
A	1,5
B1	80,0
B2	2,0
B3	8,5
B4	100,0
B5	4,0
B6	1,2
B9	0,01
B12	0,005
B15	10,0
B11	0,2
C	25,0
D2	0,1
D3	0,02
E	100,0
H	0,01
K	0,4

Таблица 3.**Суточная потребность морских млекопитающих в минеральных веществах**

Вещество	Суточная потребность на 10 кг веса / мг
Кальций	24,0
Калий	10,0
Магний	5,0
Медь	0,5
Марганец	0,2
Цинк	0,4
Железо	10,0
Молибден	0,03
Фтор	0,02
Йод	0,1
Кобальт	0,2
Фосфор	50,0

Таблица 4.

**Витаминно-минеральный комплекс “SEA TABS®
for Larger Marine Animals (Cetaceans, Pinnipeds, etc.)”**

Компонент	Содержание в 1 таб.
A	12,500 ME
B1	250 мг
B2	5,0 мг
B6	3,0 мг
B12	10,0 мкг
C	125 мг
D3	400 ME
E	50 ME
Пантотеновая кислота	5,0 мг
Ниацин	10,0 мг
Биотин	100,0 мкг
Фолиевая кислота	50,0 мкг
Инозитол	5,0 мг
Linoleic Acid	10,0 мг
Иодин	150,0 мкг
Сульфат железа	25,0 мг
Медь (CuSO ₄)	1,5 мг
Оксид магния	25,0 мг
Цинк (ZnSO ₄)	250,0 мкг
Марганец (MnSO ₄)	60,0 мкг

Таблица 5.

Состав смеси на 1 литр

1 тип	2 тип
600 мл воды / раствора регидрона 400 г филе сельди	500 мл воды 350 г филе сельди 100 мл рыбьего жира (не более 10 % от общей массы смеси)
Калорийность смеси – около 1 ккал/мл	Калорийность смеси – около 1,6 ккал/мл

Примечание: к каждому типу смеси добавляются витаминные комплексы и лецитин.

ления к его туловищу. Корпусом человек фиксирует щенка к земле, оставляя свободным пояс задних конечностей. Голова животного отводится назад и вверх в несколько запрокинутое состояние. В угол рта надавливают большим пальцем до тех пор, пока животное не откроет рот. Рот фиксируется пальцами в открытом положении. После этого в рот тюленя закладывается рыба и плавно проталкивается в глотку. При глотании следует удерживать голову животного в слегка запрокинутом состоянии. До и после каждого кормления необходимо давать животному

плавать. Плавание служит хорошим профилактическим средством от запоров и способствует нормальной дефекации.

После появления хорошего аппетита и интереса к корму животное переводится в вольер с водоемом, где оно начинает самостоятельно питаться подобранной из воды рыбой. Далее, корм вбрасывается в водоем из-за ширмы незаметно для животного. Для этого также может использоваться специальный лоток или широкая труба, один конец которой находится за ширмой, а второй опущен в бассейн. Делается это для того,

Таблица 6.

Схема кормления

День (кол- во корм- лений)	5–6 кг			7–8 кг			9–10 кг			11–12 кг		
	Р	С	Рыба	Р	С	Рыба	Р	С	Рыба	Р	С	Рыба
1 (6)	125– 150	0	0	175– 200	0	0	225– 250	0	0	0	275– 300	0
2 (6)	0	120– 140	0	0	175– 200	0	0	225– 240	0	0	280– 310	0
3 (6)	0	125– 150	0	0	150– 190		0	220– 240		0	270– 320	0
4 (6)	0	150– 180	0	0	210– 250		0	270– 300		0	330– 360	0
5 (5)	0	170– 200	100	0	210– 260	100	0	290– 320	100	0	350– 380	100
6 (5)	0	190– 220	150	0	230– 280	150	0	310– 340	150	0	370– 400	150
7 (5)	0	190– 220	200	0	230– 280	200	0	310– 340	200	0	370– 400	200
8 (5)	0	0	300	0	0	400	0	0	450	0	0	450

Примечание: Р – регидрон, мл; С – смесь, мл; Рыба, г.

чтобы животное не связывало присутствие человека с появлением корма. Во избежание перерасхода энергии время плавания животного дозируется. Происходит набор массы тела. Все контакты с животным сводятся к минимуму. По возможности поддерживается агрессивно-оборонительная реакция животного по отношению к человеку. Попытки животных к установлению контакта с персоналом должны игнорироваться или пресекаться.

Методика кормления с применением смеси на основе мульти-молока (на основе данных Alaska Sea Life Center (USA) и Tara Seal Research Center (UK))

При выкармливании щенков кольчатой нерпы и серого тюленя помимо рыбной диеты можно применять смесь, изготовленную на основе мульти-молока, специально производимого с учетом специфических потребностей организма морских млекопитающих. Опыт выкармливания щенков ластоногих в зарубежных центрах показал высокие значения прибавки в весе у щенков, приближающиеся к природным. Существуют несколько различных формул для составления рациона тюленей с применением мульти-молока.

Кормление смесью может производиться как с постепенным переводом щенка на рыбу (ASLC, www.alaskasealife.org), так и без него (TSRC, www.sealresearch.org).

Ингредиенты для приготовления молочной смеси

Мульти-молоко – молочный порошок с высоким содержанием жира. Это безлактозное молоко, содержащее 55 % жиров и 33 % белков в пересчете на сухой вес, а также включающее все необходимые минеральные элементы и витамины. Мульти-молоко производится Pet Ag, Inc., 25 Keyes Avenue, Hampshire, Illinois IL 60140, USA (www.petag.com).

Ферменты – главным образом липазы и протеазы. В незначительном количестве – лактазы (для обеспечения усвоения следовых количеств лактозы, присутствие которых возможно в мульти-молоке). Добавление ферментов повышает скорость прибавления щенками в весе, что связано с тем, что составляющие мульти-молока – главным образом полученные из коровьего молока – эффективнее усваиваются тюленями. Рекомендуется использование марки “Essential Enzymes” производства компании “Source Naturals”

(США). Можно заказать ферменты по адресу в Великобритании Earth Force Ltd, Park Chambers, 10 Hereford Road, Abergavenny, Monmouthshire, WALES NP7 5PR. Tel: +44 (0) 1873 851 953. Fax: +44 (0) 1873 851 951, e-mail: info@earthforce.com.

Витамины – возможно использование витаминов для морских млекопитающих Sea Tabs.

Рыбий жир – как правило, смесь жира сельди и макрели, однако также может быть использован жир лососевых.

Жирная рыба – сельдь, макрель, сардины.

Приготовление смеси (на 1 литр):

- 450 мл порошка мульти-молока,
 - около 60 г сельди (макрели или сардин без костей),
 - теплая фильтрованная вода – 450 мл,
 - рыбий жир – 100 г (не более 10 % от общего объема смеси, для новорожденных щенков – 5 %).
1. Перемешайте смесь блендером. Она не должна быть очень густой.
 2. Перед самым кормлением (смесь можно хранить в холодильнике в течение суток) добавьте ферменты (1 капсула на 500 мл питания) и / или витамины, 1 капсулу лецитина. Перемешайте.

В случае кормления мульти-молоком не требуется оральная регидратационная терапия!

В случае кормления мульти-молоком с добавлением ферментов оно может быть использовано взамен регидрона. Мульти-молоко содержит необходимые электролиты, которые способствуют лучшему усвоению пищи, тогда как использование мульти-молока в сочетании с регидратационной терапией лишь удвоит количество электролитов, что может произвести негативный эффект.

Частота и объем кормления

Кормить щенков следует в среднем пять раз в сутки с интервалом в четыре или чуть более часов между кормлениями. Обычно первое кормление приходится на 8.00, а последнее – на 00.00 – 02.00. При кормлении маленького щенка (вес от 5 до 10 кг, который получает до 200 мл смеси за один раз) можно сократить промежуток между кормлениями до трех часов. Через 4–5 недель, когда щенок

набирает более 15 кг веса, можно уменьшить число кормлений до 4 раз в сутки (при этом щенок уже будет получать по 450–500 мл смеси за один раз). То есть к моменту, когда щенок готов к выпуску в природу, он получает по 2000 мл смеси в сутки (табл. 6).

В Alaska Sea Life Center начиная со 2 дня реабилитации параллельно с молочным кормлением щенкам предлагается цельная рыба. Для кормления используется мелкая сельдь (150–200 г) для серых тюленей и салака для кольчатой нерпы в объеме от 10–20 % массы животного в день. После того как животное начинает есть рыбу (принудительное кормление также допускается), молочную смесь убирают из его рациона. Специалисты Tara Seal Research Center не переводят щенка на рыбу, до конца реабилитации используя только молочную смесь. В случае если сроки окончания реабилитации и природные сроки окончания лактации примерно совпадают, выкормленные на смеси щенки, попав в природную среду, успешно начинают охотиться на рыбу сами, следуя природным инстинктам.

5. Критерии и условия выпуска. Оценка готовности щенка к выпуску

Перед выпуском животного обязательно должна проводиться комиссионная оценка состояния животного на предмет пригодности его к выпуску. В состав комиссии включаются представители региональных органов Росприроднадзора, Управления ветеринарии и специалисты по реабилитации морских млекопитающих, а также сотрудники, осуществлявшие подготовку животного к выпуску.

Перед выпуском животного производятся исследования проб кала на наличие яиц гельминтов и сальмонеллез. При возможности проводятся иные вирусологические и микробиологические исследования на предмет обнаружения: морбивируса, чумы плотоядных, вируса герпеса, аденовирусной инфекции, бруцеллеза, лептоспироза.

Для перевозки животного в соответствии с действующим ветеринарным законодательством оформляется ветсвидетельство ф. 1.

При оценке степени готовности щенка к выпуску в дикую природу необходимо

Таблица 7.

Оценка степени готовности щенка к выпуску в дикую природу

Критерий	5 баллов	4 балла	3 балла	2 балла	1 балл
Общее состояние здоровья	Щенок полностью здоров, температура тела около 37 градусов, дыхание без шумов, отсутствуют гнойные выделения из глаз, носа, стул нормальный, регулярный, пройден курс дегельминтизации, результаты анализов на яйца глист и др. отрицательные, шерсть блестящая	Температура тела около 37 градусов, дыхание без шумов, могут быть незначительные выделения на слизистых оболочках, незначительные отклонения в пищеварении, пройден курс дегельминтизации, результаты анализов на яйца глист отрицательные, шерсть блестящая	Температура тела отличается от нормы не более чем на 1 градус, незначительные выделения на слизистых оболочках, периодические отклонения пищеварения, обнаружены яйца глист в фекалиях	Температура тела отличается от нормы более чем на 1 градус, присутствуют умеренные гнойные выделения из носа, глаз, стул жидкий (или запор), в фекалиях обнаружены яйца глист, шерсть тусклая	Температура тела отличается от нормы более чем на 2 градуса, дыхание затрудненное, слышны шумы, присутствуют обильные гнойные выделения из носа, глаз, стул жидкий (или запор), в фекалиях обнаружены яйца глист, шерсть тусклая, имеются признаки кожных заболеваний, расчесы, залысины
	<i>Pusa hispida botnica</i> Индекс массы тела (кн.) = 1,46 (масса щенка достигла 20–22 кг и стабильно возрастает)	ИМТ (кн.) = 1,46 (масса щенка достигла 18–20 кг и стабильно возрастает)	ИМТ (кн.) = 1,46 (масса щенка достигла 16–18 кг, нет тенденции к потере веса)	ИМТ (кн.) = 1,46 (масса щенка достигла 13–15 кг, но не стабильна)	ИМТ (кн.) < 1,46 и/или масса щенка менее 13 кг
	<i>Pusa hispida ladogensis</i> ИМТ (кн.) = 1,46 (масса щенка достигла 16–17 кг и стабильно возрастает)	ИМТ (кн.) = 1,46 (масса щенка достигла 14–15 кг и стабильно возрастает)	ИМТ (кн.) = 1,46 (масса щенка достигла 12–13 кг, нет тенденции к потере веса)	ИМТ (кн.) = 1,46 (масса щенка достигла 10–11 кг, но не стабильна)	ИМТ (кн.) < 1,46 (масса щенка менее 10 кг)
Поведение	<i>Halichoerus grypus</i> ИМТ (ст.) = 0,41/0,39 у самца/самки (масса щенка достигла 41–42 (38–39) кг и стабильно возрастает)	ИМТ (ст.) = 0,41/0,39 у самца/самки (масса щенка достигла 39–40 (36–37) кг и стабильно возрастает)	ИМТ (ст.) = 0,41/0,39 у самца/самки (масса щенка достигла 37–38 (34–35) кг, нет тенденции к потере веса)	ИМТ (ст.) = 0,41/0,39 у самца/самки (масса щенка достигла 35–36 (32–33) кг, но не стабильна)	ИМТ (ст.) < 0,41/0,39 у самца/самки (масса щенка менее 35 (32) кг)
	Полностью независим от человека, активно плавает и перемещается, демонстрирует оборонительное поведение, в воде самостоятельно ест живую рыбу	Не нуждается в присутствии человека, активно перемещается, плавает, демонстрирует оборонительное поведение, проявляет интерес к живой рыбе	Не обращает внимания на присутствие человека, может длительное время находиться в воде	Скучает в отсутствие человека, пассивен, не проявляет интереса к живой рыбе, в воду идет неохотно	Требуется постоянного присутствия человека, кричит, находясь в одиночестве, не способен самостоятельно питаться, вял, апатичен, не переносит нахождения в воде, мерзнет
Срок реабилитации	<i>P. h. (oda n/evud)</i> Возраст щенка не более 5–6 недель, следы белькового покрова исчезли не более 10 дней назад	Возраст не более 7 недель, следы белькового покрова исчезли не более 15 дней назад	Возраст не более 8 недель	Возраст не более 9–10 недель	Возраст превышает 10 недель
	<i>Halichoerus grypus</i> Возраст щенка не более 3–4 недель, следы белькового покрова исчезли не более 10 дней назад	Возраст не более 5–6 недель, следы белькового покрова исчезли не более 20 дней назад	Возраст не более 7–8 недель	Возраст не более 9–10 недель	Возраст превышает 10 недель

использовать целый комплекс критериев. Для удобства использования критерии были сведены в таблицу 7.

6. Процедура выпуска

Выпуск производится поблизости от мест сезонных залежек представителей выпускаемого вида. Для ладожской кольчатой нерпы – район островов Валаамского архипелага, для балтийской кольчатой нерпы и серого тюленя – острова Кургальского рифа, о. Малый и о. Западный Березовый. Транспортировка к месту выпуска осуществляется максимально быстро. Транспортная клетка устанавливается в нескольких метрах от воды на ровном, свободном от камней и растительности участке побережья и открывается. Выпуск тюленя не производится прямо в воду. Перенос животного к воде на руках не допускается. Тюлень, вышедший из клетки, должен добровольно пройти расстояние до воды. Животное, вернувшееся к клетке или не выходящее из нее, к выпуску не готово и нуждается в дополнительной подготовке. Перед выпуском животное в обязательном порядке метится несмываемой краской или специальными метками для мечения диких животных. При возможности на тюленей устанавливаются радиометки и проводится дальнейшее наблюдение. Процедура выпуска фиксиру-

ется посредством фото- и видеоаппаратуры. Составляется акт о выпуске животного в естественную среду обитания.

Список литературы

1. Веревкин, М. В. Морские млекопитающие Финского залива / М. В. Веревкин, Р. А. Сагитов ; под ред. д. б. н. В. М. Бельковича // Морские млекопитающие Голарктики 2006. Сборник научных трудов. – СПб, 2006. – С. 133–135.
2. Веревкин, М. В. Результаты авиаучета кольчатой нерпы на Ладожском озере / М. В. Веревкин // Динамика популяций охотничьих животных северной Европы : материалы III Международного симпозиума, 16–20 июня 2002 г., Сортавала Республика Карелия, Россия. – Петрозаводск, 2003. – С. 202–204.
3. Соколов, В. Е. Красная книга Российской Федерации. Т. 1. Животные // В. Е. Соколов, М. Я. Смелова, В. А. Бычков. – АСТ, Астрель, 2000. – 863 с.
4. Тормосов, Д. Д. Балтийская кольчатая нерпа / Д. Д. Тормосов, А. Г. Есипенко // Редкие и исчезающие виды млекопитающих СССР. – М. : Наука, 1990. – С. 50–57.
5. Чапский, К. К. Ладожский тюлень и возможность его промысла / К. К. Чапский // Отчет для Ленинградского Исследовательского института рыболовства. – 1932. – С. 147–157.
6. Harding, K. Development in the Baltic grey seal (*Halichoerus grypus*) and ringed seal (*Phoca hispida*) populations during the 20th century / K. Harding, T. Härkönen. – *Ambio*, 28. – 1999. – P. 619–627.
7. Kovacs, K. Pusa hispida / K. Kovacs, L. Lowry, T. Härkönen // 2008 IUCN Red List of Threatened Species. – IUCN (on-line www.iucnredlist.org). – 2008.



МОСКОВСКИЙ ВЕТЕРИНАРНЫЙ ВЕБ-ЦЕНТР

webmvc.com



Заболел Ваш домашний питомец? Не отчаивайтесь - посетите наш веб-центр!

У нас Вы найдете исчерпывающую информацию о болезни Вашего друга, лечении, профилактике и других вопросах ветеринарии. Также на нашем сайте Вы можете найти адрес ближайшей к Вам ветеринарной клиники, чтобы обратиться за помощью к специалистам.

Кроме этого, наш веб-центр располагает полным спектром информации по уходу за животными - будь то кошки или собаки, птицы или рыбы, черепахи или экзотические животные. Вы научитесь, как правильно разводить, кормить, дрессировать и воспитывать своих домашних питомцев. На страницах нашего сайта с Вами делятся опытом и советами признанные авторитеты в области ветеринарии и ухода за животными. К Вашим услугам - энциклопедические справочники и научные статьи о животном мире, фото и видеоматериалы, ежедневные новости и тематический форум.

Мы ждем Вас по адресу **www.webmvc.com**



Pet Vet Russia Expo

23-25 Мая 2013, Москва, Россия

ПОЛНЫЙ СПЕКТР ТОВАРОВ И УСЛУГ ДЛЯ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ

реклама

Ветеринарное
оборудование и препараты



Средства ухода
и содержания



Корма и витаминно-
минеральные добавки



← ↑ →
**ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ
ВЫСТАВКИ**
↓

Аквариумистика



Конкурс Грумеров



ПрактиВет+

Ветеринарная
конференция



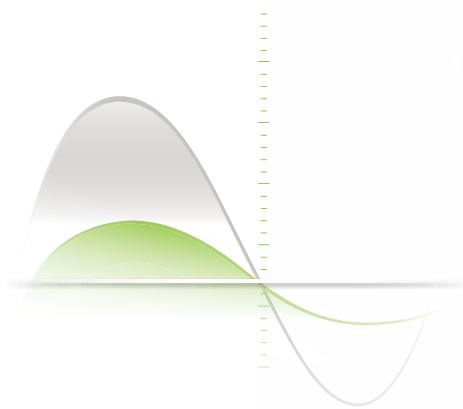
**СПЕЦИАЛЬНЫЕ
МЕРОПРИЯТИЯ**



Асти Групп
выставочная компания

Тел.: +7 495 797 69 14, факс: +7 495 797 69 15
E-mail: info@zoorussia.ru www.zoorussia.ru

Гамма ветеринарных диет
Diabetic Royal Canin
 для кошек и собак,
 страдающих
сахарным диабетом



Диеты Diabetic
 помогают лучше
 контролировать
 постпрандиальную
 гипергликемию



реклама

НОВИНКА!



НОВИНКА!

Гамма ветеринарных диет Diabetic:

Благодаря повышенному содержанию белка, пониженной энергоемкости, умеренному содержанию пищевых волокон и низкому содержанию углеводов ветеринарные диеты Diabetic помогают контролировать гипергликемию у кошек и собак, страдающих сахарным диабетом.

Результат: стабилизация состояния и улучшение качества жизни ваших пациентов!

ДНИ ВЕТЕРИНАРИИ НА ВЫСТАВКЕ «ЗООСФЕРА-2012»

С 11 по 13 октября в Санкт-Петербурге в выставочном комплексе «Ленэкспо» состоится крупнейшая в России выставка товаров и услуг для домашних животных «Зоосфера». В рамках выставки пройдут Дни ветеринарии с обширной деловой программой.

Появившись в 1993 году, «Зоосфера» стала первой в России специализированной выставкой товаров и услуг для домашних животных. С тех пор она ежегодно подтверждает статус главного отраслевого события. В «Зоосфере-2012» примет участие более 250 компаний. Уже сегодня свое участие подтвердили компании из России, Белоруссии, Бразилии, Бельгии, Великобритании, Германии, Италии, Китая, Латвии, Таиланда, Украины, и этот список постоянно растет.

На выставке будет представлена обширная деловая программа, которая затронет многие актуальные вопросы отрасли. 12–13 октября пройдет ряд тематических мероприятий, посвященных вопросам ветеринарии. Одним из центральных станет мастер-класс по ветеринарной стоматологии, который проведут Дэвид Кроссли, доктор Британской ветеринарной медицины, доктор философии, член Королевского колледжа ветеринарной хирургии, и Анна Спирина, доктор ветеринарной медицины, президент Европейской высшей школы ветеринарной стоматологии, действительный член Европейской Ассоциации ветеринарной стоматологии. На мастер-классе будут рассмотрены следующие темы: орофациальная анатомия, рентгенография, рутинная челюстно-лицевая хирургия, техника экстракции зубов, работа с мягкими тканями ротовой полости, ороназальная фистула, а также ряд вопросов челюстно-лицевой хирургии. Мастер-класс платный, более подробная информация – на сайте выставки www.zoosphere.expoforum.ru.

Кроме того, в рамках Дней ветеринарии пройдет студенческая конференция, организованная совместно с Санкт-Петербургской государственной академией ветеринарной медицины. На конференции выступят с докладами научные сотрудники СПбГАВМ. Одним из основных докладов станет выступление коллектива ученых на тему «Кампилобактериоз собак». Также состоится выступление Дмитрия Пудовкина, кандидата ветеринарных наук, доцента кафедры клинической диагностики СПбГАВМ, на тему «Лабораторная диагностика пиелонефрита собак». Докладчик расскажет о клинко-эпизоотологическом, серологическом, бактериологическом методах диагностики этого заболевания.

В рамках Дней ветеринарии Управление по ветеринарии по Санкт-Петербургу организует выездной семинар в одну из лучших ветеринарных клиник Санкт-Петербурга и Северо-Западного региона, а также ряд научно-практических конференций на темы: «Болезни хрусталика у собак», «Сухой кератоконъюнктивит», «Патология суставов у собак», «Лабораторные тесты для диагностики патологий опорно-двигательной системы у собак».

Впервые на «Зоосфере» будет организован Съезд для владельцев клубов и питомников. В научной части Съезда состоится мероприятие на тему «Искусственное осеменение мелких домашних животных», докладчиком выступит Назарова Е. А. действительный член Российского общества ветеринарной репродукции, практикующий ветеринарный врач-репродуктолог, специалист ультразвуковой диагностики. Другой актуальной темой будут «Роды у собак: эндокринология, физиология. Осложненные роды», докладчик Титов А. С., кандидат ветеринарных наук, директор ветеринарной клиники «Радан». Пройдут лекции на тему иммунитета и патологий иммунной системы домашних животных, а также – «Генетическая наследственность. Практическая генетика домашних животных в России».

В деловой части Съезда участники обсудят новые правила ввоза и вывоза домашних, в том числе экзотических, животных. Состоится Круглый стол «Зооиндустрия – таможня, ветеринария, транспорт».

В деловой части Съезда участники обсудят новые правила ввоза и вывоза домашних, в том числе экзотических, животных. Состоится Круглый стол «Зооиндустрия – таможня, ветеринария, транспорт».

Ждем вас 11–13 октября в выставочном комплексе «Ленэкспо»!

