

**ГУМБЕРИДЗЕ МАКСИМ МАКСИМОВИЧ**

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА «АЛЛОКИН-АЛЬФА»  
ПРИ АЛЕУТСКОЙ БОЛЕЗНИ НОРОК**

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата ветеринарных наук

Работа выполнена на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (ФГБОУ ВО СПбГУВМ)

**Научный руководитель:** **Сухинин Александр Александрович**, доктор биологических наук, профессор

**Официальные оппоненты:** **Косовский Глеб Юрьевич**, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева», директор

**Шамова Ольга Валерьевна**, доктор биологических наук, доцент, член-корреспондент РАН, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», заведующая отделом общей патологии и патологической физиологии

**Ведущая организация** – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова»

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 202\_ года в \_\_:\_\_ часов на заседании диссертационного совета 35.2.034.01 при ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д.5; тел/факс (812) 388-36-31, e-mail: [secretary@spbguvm.ru](mailto:secretary@spbguvm.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО СПбГУВМ по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская д.5., и на официальном сайте <http://spbguvm.ru>

**Автореферат разослан:** «\_\_» \_\_\_\_\_ 202\_ г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Кузнецова Надежда Викторовна

## 1. Общая характеристика работы

**Актуальность темы.** Отрасль пушного звероводства в России, начиная с конца 20-х годов прошлого века, считалась одной из наиболее рентабельных и перспективных, поскольку обеспечивала население натуральной продукцией и формировала сырьевую базу мирового экспорта пушнины (Балакирев Н.А., 2011; Ивонина О.Ю., 2020). Однако, с середины 90-х годов, объем производства шкурковой продукции в Российской Федерации стал стремительно сокращаться, что было связано со сложной экономической обстановкой в стране, низким уровнем кормления и нестабильностью кормовых баз, а также снижением покупательской способности населения (Ильина Т.Н., 2017; Коновалов А.М., 2016; Косовский Г.Ю., 2020). В особенности пострадало норководство, где наряду с вышеперечисленными факторами свою роль сыграло широкое распространение Алеутской болезни норок, вызванное отсутствием средств лечения и профилактики. В период с 1990 по 2000 гг., в России прекратили существование около 50% зверосовхозов, часть из которых были ликвидированы в связи со 100% поражением основного поголовья Алеутской болезнью. Количество норок при этом сократилась с 1,9 млн до 437 тыс. голов (Балакирев Н.А., 2020; Геллер В.И., 2015). Основные потери складываются из-за разницы в цене от реализации шкурки клинически здоровых и больных животных и массовой гибели поголовья, что приводит к падению рентабельности производства (Балакирев Н.А., 2011; Домский И.А., 2011; Косовский Г.Ю., 2020). В результате, отечественные звероводческие хозяйства теряют способность конкурировать с зарубежными производителями пушнины. На данный момент, в нашей стране болезнь встречается в некоторых регионах, поражая в отдельных звероводческих хозяйствах до 70% поголовья (Осипова Н.Н., 2019; Пушкарев М.Г., 2019; Федорова О.И., 2018).

Разработка и внедрение в широкую практику эффективных методов борьбы с вирусным плазмозитозом всегда оставалось одной из сложнейших задач ветеринарной науки, учитывая колоссальный экономический урон, наносимый болезнью. Эффективная профилактика Алеутской болезни становится возможной при использовании отечественных, качественных и инновационных препаратов – индукторов эндогенного интерферона. По нашему мнению, одним из таких перспективных препаратов может являться индуктор интерферона «Аллокин-альфа» (РУ N002829/01-210610, разработчик — ООО «Аллоферон», Москва). Основным действующим веществом препарата является синтетический линейный олигополипептид аллоферон, состоящий из 13 L-аминокислот. По своей химической структуре, аллоферон полностью идентичен природному аллоферону, однако являясь синтетическим продуктом обладает рядом свойств: стабилен и однороден по составу, быстро и без остатка подвергается биodeградации, размер молекул аллоферона ниже порога иммуногенности, благодаря чему препарат не вызывает аллергических реакций. Как пептид, имеет высокую метаболическую активность, низкую вероятность привыкания и возникновения побочных эффектов (Ларионова О.С, 2023; Ларионов С.В., 2023; Козлов С.В., 2023; Шамова О.В, 2021). Аллоферон обладает цитокиноподобным действием и является индуктором эндогенного интерферона, способностью активации цитотоксических Т-клеток, стимуляции НК-клеток — ключевых звеньев иммунной системы (Черныш С.И., 2012; Lee N., 2011).

Успешные испытания препарата «Аллокин-альфа» в медицине послужили основанием для проведения исследования действия данного препарата на животных, в частности изучение его эффективности при Алеутской болезни норок, которая в настоящее время специфически не профилируется и лечению не поддается.

**Степень разработанности темы исследования.** Начиная со второй половины прошлого

века, были предложены различные способы иммунизации норок против вирусного плазмодитоза. Однако, применение инактивированных формолвакцин приводило к усиленному плазмодитозу и повышению уровня гамма-глобулина. Использование ДНК-вакцин оказывало частичный эффект за счет незначительного снижения уровня гамма-глобулина, что не предотвращало гибель норок. Применение вакцин на основе белковых субъединиц также приводило к выраженной гипергаммаглобулинемии и высокой смертности (Liu D., 2018; Lu T., 2021; Markarian N.M., 2021).

Применение различных биологических активных добавок в рационах больных вирусным плазмодитозом норок нашло положительный эффект, однако, по большей части он был направлен на минимизацию последствий болезни, за счет улучшения общего клинического состояния больных животных, не обеспечивая снижение вирусной нагрузки (Аминин Д.Л., 2017; Бельтюкова З.Н., 2018; Farid A.H., 2020).

**Цель исследования:** Определить эффективность препарата «Аллокин-альфа» при Алеутской болезни норок и разработать эффективную схему профилактических мероприятий при вирусном плазмодитозе молодняка норок с применением препарата «Аллокин-альфа».

**Задачи исследования:**

1. Провести анализ эпизоотологической ситуации по Алеутской болезни норок в звероводческом хозяйстве Северо-Западного региона Российской Федерации.
2. Провести ПЦР-анализ клинических образцов на наличие генома вируса Алеутской болезни у зараженных вирусом Алеутской болезни норок после применения препарата «Аллокин-альфа».
3. Оценить действие препарата «Аллокин-альфа» на степень морфофункциональных изменений органов и тканей больных вирусным плазмодитозом норок.
4. Проследить динамику биохимических показателей крови больных Алеутской болезнью норок на фоне применения препарата «Аллокин-альфа».
5. Оценить эффективность препарата «Аллокин-альфа» на клиническую симптоматику, сохранность животных и товарные показатели получаемых шкур при Алеутской болезни норок.
6. Разработать схему профилактических мероприятий при вирусном плазмодитозе молодняка норок с применением препарата «Аллокин-альфа».

**Научная новизна работы.** Впервые показана эффективность противовирусного средства, индуктора эндогенного интерферона - «Аллокин-альфа» у норок при Алеутской болезни. Разработана эффективная схема применения препарата для профилактики вирусного плазмодитоза у молодняка норок. Получены данные о достоверном сокращении концентрации глобулинов, мочевины, креатинина и активности аминотрансфераз, а также о существенном уменьшении интенсивности морфологических изменений внутренних органов у больных Алеутской болезнью норок после применения «Аллокин-альфа». Впервые установлено отсутствие генома возбудителя вирусного плазмодитоза у 40% больных животных, после применения «Аллокин-альфа». Определено снижение смертности, увеличение массы тела и размеров получаемых шкур у больных Алеутской болезнью норок при применении «Аллокин-альфа». Научная новизна работы подтверждена патентом на изобретение - RU2742160C1, Способ лечения Алеутской болезни норок, опубликован в Государственном реестре изобретений и полезных моделей РФ 02.02.2021г., Бюл. № 4 (получен до вступления в силу приказа года № 657 – об утверждении ветеринарных правил осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и

отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов алеутской болезни норок).

**Теоретическая и практическая значимость.** Результаты проведенных научных исследований имеют высокую теоретическую значимость и практическую ценность, поскольку являются основой для патогенетически обоснованного подхода к дальнейшей разработке и совершенствованию мероприятий по профилактике вирусного плазмозитоза.

Диссертационное исследование расширяет теоретическое представление о влиянии индукторов эндогенного интерферона на организм норок больных вирусным плазмозитозом. Практическая значимость исследования заключается в разработке и внедрении в клиническую практику схемы проведения профилактических мероприятий при Алеутской болезни у молодняка норок. Теоретически обосновано и экспериментально подтверждено, что применение противовирусного средства «Аллокин-альфа» больным Алеутской болезнью норкам способствует улучшению их физиологического состояния, что положительно отражается, и обеспечивает повышение экономической эффективности хозяйств, пострадавших от вирусного плазмозитоза, за счет дополнительно получаемой продукции.

Разработанный способ профилактики Алеутской болезни норок, а также результаты научных исследований используются практикующими ветеринарными врачами.

Исследование по оценке эффективности применения препарата «Аллокин-альфа» при Алеутской болезни норок, были проведены согласно договору между ФГБОУ ВО СПбГАВМ и ООО «АЛВИЛС» (г. Москва).

Полученные результаты используются при разработке технологической документации на препарат «Аллокин-альфа» для ветеринарного применения, а также в учебном процессе ФГБОУ ВО СПбГУВМ.

**Методология и методы исследования.** Методологические подходы в решении задач основаны на патогенезе, эпизоотологии, биологических свойствах возбудителя вирусного плазмозитоза и особенностях проявления инфекционного процесса у зараженных норок. При выборе методов исследования, также учитывали условия содержания норок на звероводческих фермах, режим кормления, поения, пол и возраст животных.

При выполнении работы были использованы следующие методы исследований: вирусологический, серологический, молекулярно-генетический, гистологический, биохимический, клинические, зоотехнические и статистические. Для проведения исследований применялись актуальные приборы отечественных и зарубежных производителей.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. ПЦР-анализ не выявляет наличие ДНК возбудителя у части зараженных вирусом Алеутской болезни норок в результате применения препарата «Аллокин-альфа».
2. Морфофункциональные изменения органов и тканей норок инфицированных вирусом Алеутской болезни, имеют низкую степень развития на фоне применения «Аллокин-альфа».
3. «Аллокин-альфа» оказывает положительное влияние на динамику биохимических показателей крови норок зараженных вирусом Алеутской болезни.
4. Применение «Аллокин-альфа» предупреждает развитие клинической картины Алеутской болезни норок, обеспечивает снижение смертности и повышение товарных показателей шкурок, получаемых от зараженных вирусом Алеутской болезни норок.
5. Разработана эффективная схема профилактических мероприятий при вирусном плазмозитозе с применением препарата «Аллокин-альфа» норкам в возрасте 30 дней,

подкожно, в дозе 0,5 мг на животное двукратно с интервалом 6 дней.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Основные положения диссертации были представлены на: 75-й юбилейной международной научной конференции молодых ученых и студентов СПбГУВМ (Санкт-Петербург, ФГБОУ ВО «СПбГУВМ», 5-9 апреля 2021 г.), X юбилейной международной научной конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны» (Санкт-Петербург, ФГБОУ ВО «СПбГУВМ», 23-24 ноября 2021 г.), международной научно-практической конференции «Современные проблемы природопользования, охотоведения и звероводства» посвященная 100-летию ВНИИОЗ и 150-летию со дня рождения основателя и первого директора института, профессора Б. М. Житкова (Киров, ФГБНУ «ВНИИОЗ», 23-26 мая 2022 г.), международной научно-практической конференции "Инновационные решения актуальных вопросов биобезопасности" (Казань, ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», 2 декабря 2022 г.).

**Публикации материалов исследований.** По материалам диссертации опубликовано 8 статей, из них 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, одна из которых индексируется в международной базе данных Scopus и 4 публикаций в материалах научных и научно-практических конференций. Получен один патент.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 145 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов, заключение, практические предложения, перспективы дальнейшей разработки темы, список использованной литературы, приложения.

Работа иллюстрирована 8 таблицами и 33 рисунками. Список литературы включает 214 источников, в том числе 84 источника зарубежных авторов.

## **2. Основное содержание работы**

### **2.1 Материалы и методы исследования**

Работа выполнена на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (ФГБОУ ВО СПбГУВМ) Министерства сельского хозяйства Российской Федерации. Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

#### **2.1.1 Экспериментальные животные**

В работе использовано 240 голов норок (160 самок и 80 самцов) с суточного до 210-дневного возраста. Отобранные животные были разделены по методу групп аналогов на контрольную и подопытную группы. За каждой группой был закреплен отдельный обслуживающий персонал. Зверей содержали в отдельно стоящих, изолированных, двухрядных шедрах. Кормление зверей проводили согласно стандартным рационам, вручную, один раз в сутки.

#### **2.1.2 Характеристика препарата «Аллокин-альфа»**

Препарат «Аллокин-альфа» представляет собой отечественный индуктор эндогенного интерферона на основе аллоферона – синтетического олигополипептида, обладающего цитокиноподобным действием, способностью активации цитотоксических Т-клеток, стимуляции НК-клеток (РУ N002829/01-210610, разработчик — ООО «Аллоферон», Москва).

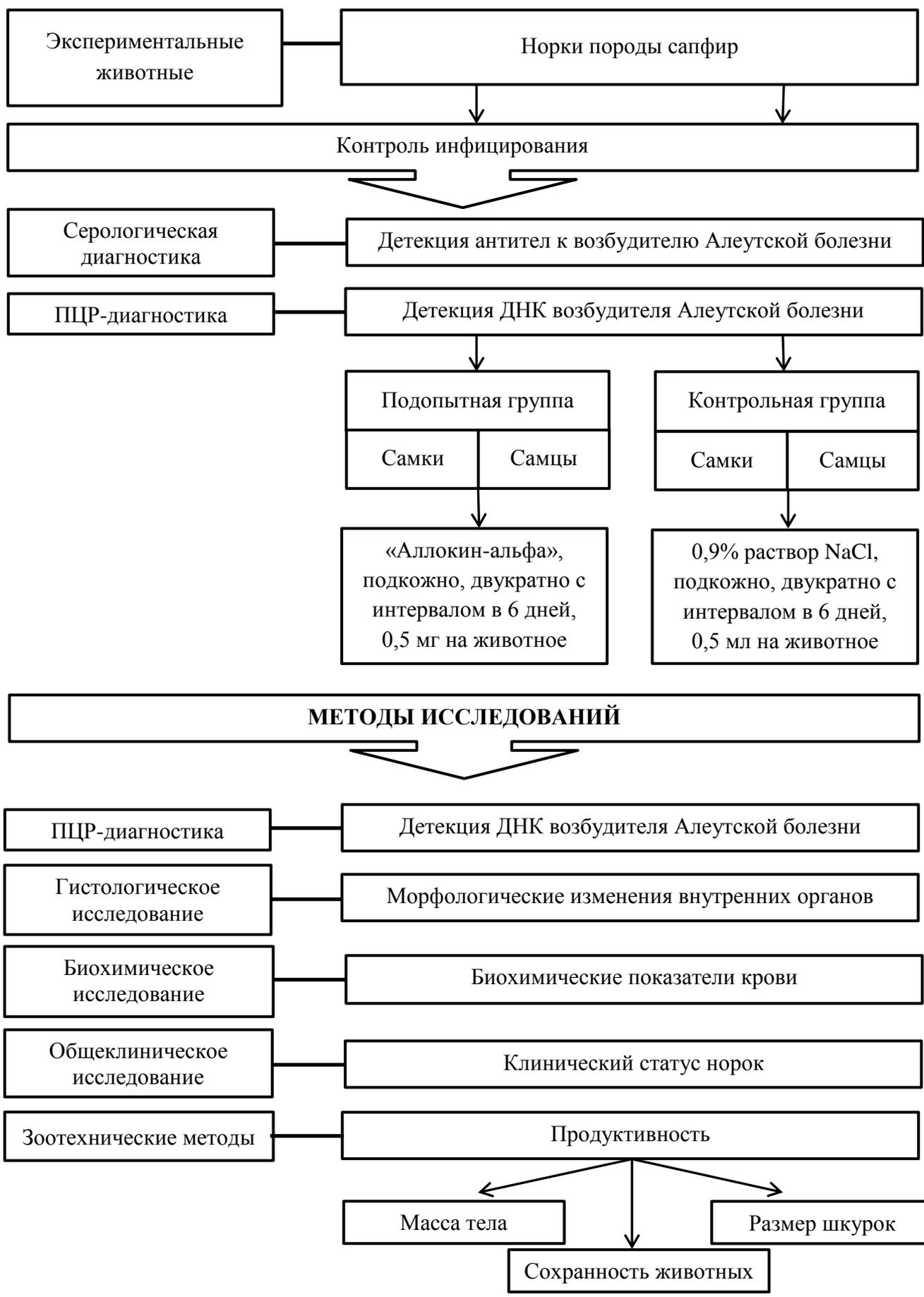


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Аллоферон стабилен и однороден по составу, быстро и без остатка подвергается биодegradации, обладает специфической активностью, низкой токсичностью, отсутствием мутагенности и канцерогенности. Размеры молекулы аллоферона ниже порога иммуногенности, не вызывают аллергических реакций и не стимулируют образование антител к полученному интерферону.

### **2.1.3 Схема применения препарата «Аллокин-альфа»**

При разработке схемы применения препарата «Аллокин-альфа» мы учитывали особенности патогенеза, эпизоотологии и биологические свойства возбудителя, а также положительные результаты применения препарата отечественных исследователей и рекомендации производителя (Ершов Ф.И., 2007; Тыньо Я.Я., 2017).

Схема применения препарата «Аллокин-альфа»: Норкам подопытной группы, в возрасте 30 дней вводили препарат в виде подкожных инъекций двукратно с интервалом в 6 дней в дозе 0,5 мг на животное. Для приготовления раствора ампулу препарата «Аллокин-альфа», содержащую 1 мг аллоферона, разводили в 1 мл стерильного физиологического раствора (0,9% NaCl). После разведения, препарат инъецировали в кожную складку в области холки, в объеме 0,5 мл на животное. Через 6 дней инъекцию «Аллокин-альфа» повторили. Норкам контрольной группы того же возраста подкожно вводили стерильный физиологический раствор (0,9% NaCl) в том же режиме дозирования. Инъекцию осуществляли в кожную складку в области холки, в дозе 0,5мл на животное. Спустя 6 дней процедуру повторяли.

### **2.1.4 Методы серологического исследования. Постановка реакции иммуноэлектроосмофореза**

Постановку реакции иммуноэлектроосмофореза (РИЭОФ) проводили с использованием прибора "ПЭФ-3" (ОАО «Медлабортехника», Россия) для электрофореза, иономера И-160МИ (ООО "Измерительная техника", Россия), лабораторной центрифуги OHAUS FC5515R («OHAUS Corporation», США), микропипеток BIOBASE MicroPette («BIOBASE», Германия), агара для электрофореза, заливочного столика, пробойника диаметром 2,5 мм, стеклянных пластинок 8x15 см, стеклянных капилляров, фильтровальной бумаги и дистиллированной воды. Для реакции применяли стеклянные пластины с 0,7% агаровым гелем. В роли антигена служила вирус-содержащая суспензия диагностикума (ТОО «ИМГЕН», Россия), контроль проводился при помощи положительной контрольной сыворотки (ТОО «ИМГЕН», Россия). В качестве буферного раствора применялся барбитал-ацетатный буфер (рН 8,6).

Объектом исследования выступала кровь из периферических сосудов пальца животных, которую по каплям собирали в стеклянные капилляры и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 минут. Полученную сыворотку крови вносили в лунки четного вертикального ряда первых 10 горизонтальных рядов при помощи микропипетки по 8-10 мкл. Для контроля реакции, в четные лунки 11-го ряда вносили контрольную положительную сыворотку. В оставшиеся нечетные колонки вносили антиген в объеме 8-10 мкл и помещали пластину с нанесенным материалом в камеру для электрофореза, предварительно заполненную буферным раствором. К противоположным краям пластины присоединяли по 4 фитиля из фильтровальной бумаги и закрывали камеру. Электрофорез проводили в течение 30 мин при напряжении 120 В. Оценку результатов проводили визуально по появлению полос преципитации. При сомнительном результате проводили повторную диагностику.

### **2.1.5 Методы молекулярно-генетического исследования**

ПЦР-диагностику проводили из проб фекалий массой по 1-3 г. Для выделения ДНК применяли коммерческий комплект реагентов АмплиПрайм ДНК-сорб-В (ООО «НекстБио», Россия) согласно инструкции производителя. Из отобранного материала готовили 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе (NaCl 0,9%). Полученную суспензию центрифугировали при 10-12 тыс об/мин в течение 2 мин. Экстракцию ДНК проводили из 100 мкл надосадочной жидкости. ПЦР проводили с помощью коммерческого набора реагентов для амплификации «Тест-система "АБН"» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Амплификацию проводили на амплификаторе Терцик (ООО «НПО ДНК Технология», Россия) согласно протоколу производителя, в конечном объеме реакционной смеси 25 мкл, содержащей 10 мкл ДНК-пробы. Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза в 2% агарозном геле «TopVision Agarose» (Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением «GelRed» (Biotium, США). Электрофорез проводили при напряжении 85В в течение 35 минут. Результаты электрофореграммы визуализировали с использованием трансиллюминатора Cellmager с программным обеспечением Quantity One – 4.6.3. (Basic) («Bio-Rad», Франция).

### **2.1.6 Методы гистологического исследования морфологии органов**

Гистологические исследования внутренних органов норок проводили через 6 месяцев после применения «Аллокин-альфа». Отбирали печень, почки, селезенку, яичники и семенники. Органы помещали в стеклянную посуду и фиксировали в течение 2–4 суток в 10% растворе буферного формалина, объем которого в 10-20 раз превышал объем пробы. Далее материал высушивали и заливали в парафин. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 5-7 мкм на микротоме РОТМИК-2М (ЗАО «ОРИОН МЕДИК», Россия) и окрашивали гематоксилин-эозином. Анализ полученных препаратов проводили при помощи светооптического микроскопа Микмед-5 (ОАО «ЛМО», Россия) при 10-, 40-, 100-кратном увеличении. Микрофотографии делали с помощью камеры МС-3 № ХС 1272 (ООО «ЛМО-МА», Россия); фото и анализ изображений сделаны в программе МСview.

### **2.1.7 Исследование биохимических показателей крови**

Биохимические исследования крови норок контрольной и подопытной групп проводили в динамике эксперимента через 1, 3 и 6 месяцев. Отбор материала осуществляли до кормления животных из кончика хвоста. Кровь по каплям собирали в пластиковые пробирки Improvacuter (Китай) с активатором свертывания крови (SiO<sub>2</sub>). Пробы доставляли в клиничко-биохимическую лабораторию ФГБОУ ВО СПбГУВМ с учетом температурного режима хранения (+4°C). Биохимические исследования проводили на автоматическом биохимическом анализаторе Clima MC-15 (RAL, Испания) с автоматической системой расчета. Измеряли уровень общего белка, альбумина, глобулина, мочевины, креатинина, активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ).

### **2.1.8 Исследование клинического статуса норок**

Общесукупительное состояние животных оценивали клиническими методами исследования. Учитывали состояние слизистых оболочек, подвижность, координацию движений, положение тела в пространстве, поведение, аппетит, реакцию на внешние раздражители, состояние и качество мехового покрова.

### **2.1.9 Зоотехнические методы исследования**

В обеих группах животных определяли изменение массы тела в начале каждого месяца при помощи электронных весов OHAUS V71P15T («OHAUS Corporation», США). Ввели учет сохранности животных, а также определяли размеры шкурок после убоя с помощью показателей длины от междуглазья до корня хвоста и удвоенной ширины шкурки с использованием измерительной ленты.

### **2.1.10 Статистическая обработка данных**

Обработку полученных данных производили с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Результаты обрабатывали с использованием компьютерных программ Statistika 10.0, (Stat.Soft, Inc., США) и Microsoft Office Excel 2016.

## **3. Результаты исследований**

### **3.1 Изучение эпизоотологической ситуации по Алеутской болезни норок в звероводческом хозяйстве Северо-Западного региона Российской Федерации**

Впервые клинические и патологоанатомические признаки вирусного плазмодитоза у норок в хозяйстве были отмечены в 2018 году. Наблюдали снижение активности и аппетита у животных, живой массы и расстройство процессов пищеварения. У некоторых особей отмечали анемию видимых слизистых оболочек и повышенную жажду. Шерсть у таких норок была тусклой и взъерошенной. Фиксировали аборты и пропустовавших самок. При патологоанатомическом вскрытии выявляли наличие язв небольшого размера на слизистой оболочке ротовой и носовой полостей у некоторых животных, почки имели сморщенный вид, уменьшены в объеме, серо-желтого цвета, с легко отделяемой капсулой. Печень увеличена в объеме и имела окрас мускатного ореха.

Для установления причины появления патологических признаков и гибели норок в хозяйстве были проведены серологические и молекулярно-генетические исследования. Серологические исследования проводили в РИЭОФ согласно общепринятой методике. Сомнительные результаты РИЭОФ, полученные в ходе диагностики были подвергнуты повторному исследованию с новой пробой сыворотки. Повторно подтвержденные сомнительные пробы были определены как положительная реакция.

В результате проведенной РИЭОФ установлено 56% положительных и 44% отрицательных пробы. ПЦР-исследование показало у всех экспериментальных животных положительную реакцию на наличие ДНК вируса Алеутской болезни норок.

### **3.2 ПЦР-диагностика**

На завершающей стадии опыта, через 6 месяцев после применения «Аллокин-альфа», проводили ПЦР-диагностику с электрофоретической детекцией, на наличие генома вируса Алеутской болезни у норок участвующих в эксперименте.

В результате проведенного анализа, во всех исследуемых пробах от норок контрольной группы были зарегистрированы амплифицируемые фрагменты длиной 176 п.н., что свидетельствует о наличии у этих животных копий ДНК возбудителя вирусного плазмодитоза. Образование данных фрагментов было строго специфично. Результаты ПЦР-диагностики контрольной группы норок представлены на рисунке 2.

В подопытной группе животных, получавших препарат «Аллокин-альфа», у 40% особей, ДНК возбудителя вирусного плазмодитоза выявлено не было. Результаты ПЦР-диагностики

подопытной группы норок представлены на рисунке 3.

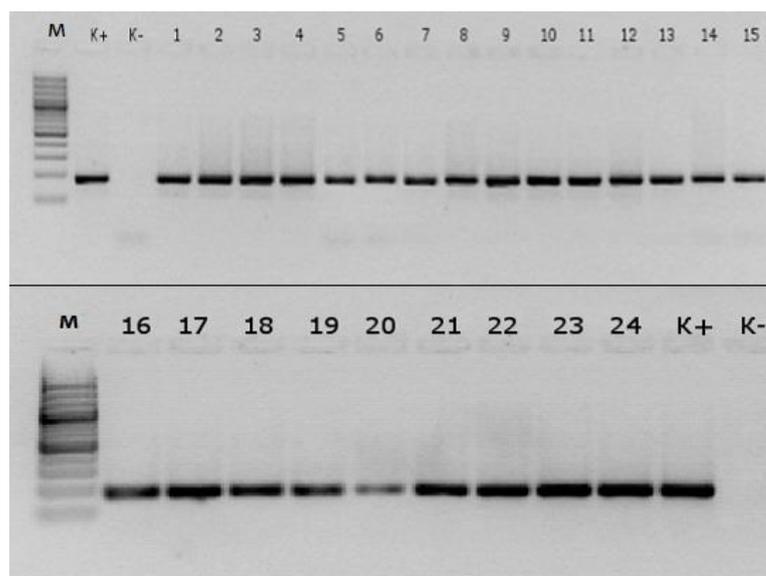


Рисунок 2 – Электрофореграмма продуктов амплификации норок контрольной группы (обозначения: 1-8 – самцы норок, 9-24 – самки норок, K+ – контроль положительный, K- – контроль отрицательный, M – маркер молекулярной массы).

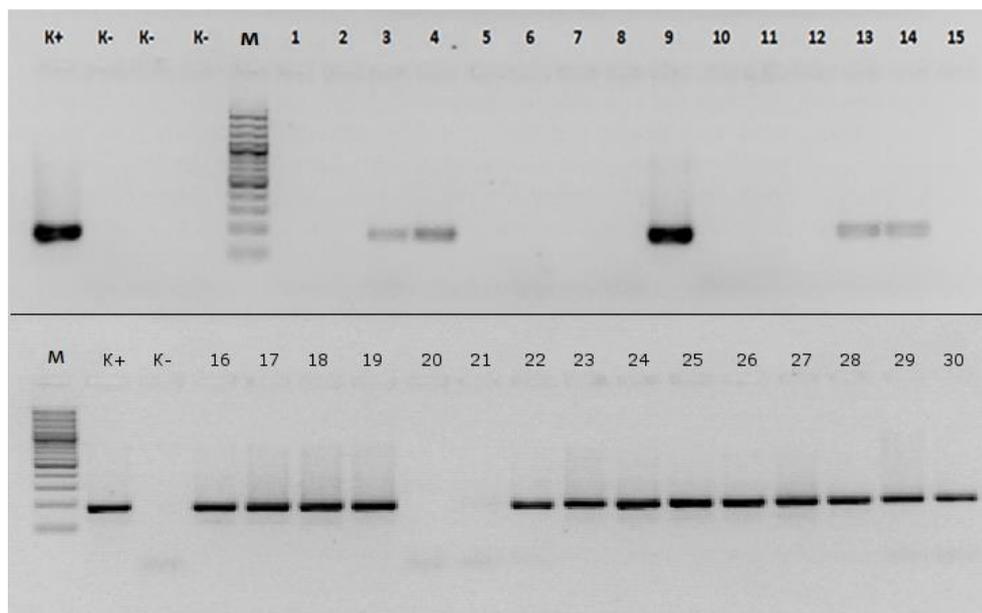


Рисунок 3 – Электрофореграмма продуктов амплификации норок подопытной группы (обозначения: 1-10, 21-30 – самки норок, 11-20 – самцы норок, K+ – контроль положительный, K- – контроль отрицательный, M – маркер молекулярной массы).

### 3.3 Гистологический анализ морфофункционального состояния внутренних органов животных в эксперименте

При анализе гистологических срезов почек норок контрольной группы выявлены признаки поздних стадий развития мезангиально-пролиферативного гломерулонефрита. Наблюдались увеличение толщины мезангиального матрикса почечных телец, сужение просвета капилляров, отечность клубочков, а также лимфоплазмоцитарная инфильтрация (Рисунок 4 А). В мозговом веществе встречались очаговые, местами сливающиеся

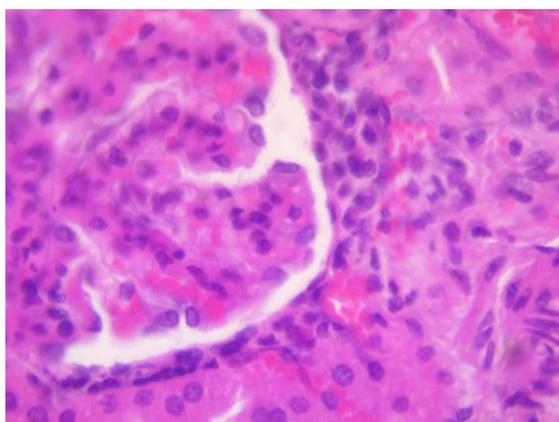
кровоизлияния, а также наблюдались микроскопические участки кальциноза. У подопытных особей были обнаружены схожие признаки, выраженные от слабой до средней степени. Наблюдались численное увеличение мезангиальных клеток и незначительное расширение внеклеточного матрикса в мезангии клубочков, облитерация просветов капилляров имела низкую степень развития, а лимфоплазматическая инфильтрация была выражена значительно слабее (Рисунок 4 Б).

Гистологическое исследование срезов печени животных контрольной группы показало наличие тотальной гидропической дистрофии. Выявлены локальные кровоизлияния, пролиферация клеток и очаги лимфоплазматической инфильтрации эпителия желчевыводящих протоков и стромы печени. Дистрофические изменения в подопытной группе были выражены слабее. Лимфоплазматическая инфильтрация, пролиферация клеток эпителия желчевыводящих протоков и признаки развития холангита проявлялись в меньшей степени, а локальные очаги лимфоплазматической инфильтрации отсутствовали. Гистологические срезы печени норок в эксперименте представлены на рисунках 5,6.

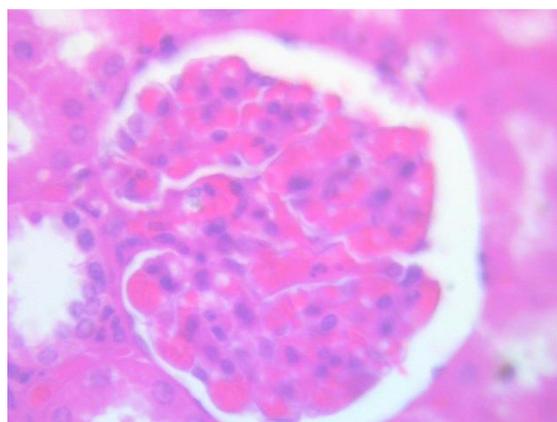
В селезенке животных контрольной группы микроскопически наблюдали гиперплазию вторичных лимфатических фолликулов. Они увеличены в размерах и имели четкие, хорошо выраженные центры. По периферии фолликулов и вокруг кровеносных сосудов наблюдались очаговые скопления плазматических клеток. В гистологических срезах селезенки подопытных животных также наблюдали гиперплазию фолликулов, однако степень лимфоплазматической инфильтрации была менее выражена.

В яичниках самок контрольной группы обнаруживали лимфоплазматическую инфильтрацию, выявляли большое количество атретических тел. В подопытной группе отмечали возрастающее число первичных фолликулов при снижении атретических. Лимфоплазматическая инфильтрация была выражена значительно слабее.

В контрольной группе самцов, в извитых канальцах семенников выявляли сперматогенный эпителий с признаками апоптоза и дегенерации. В придатке и извитых канальцах присутствовали микроскопические очаги лимфоцитарной инфильтрации. У самцов из подопытной группы степень лимфоплазматической инфильтрации и число ее очагов было в несколько раз ниже.

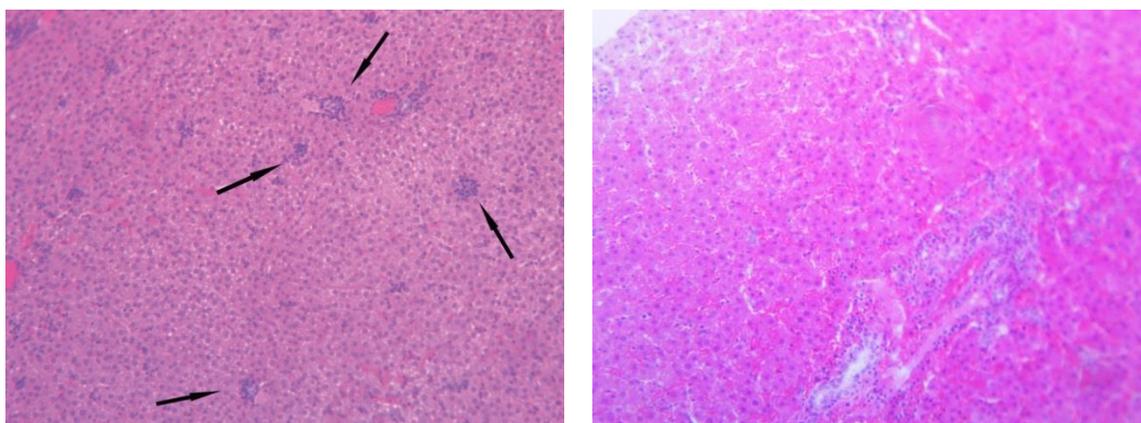


А – контрольная группа



Б – подопытная группа

Рисунок 4 – Гистологические срезы почек норок в эксперименте (окрашивание гематоксилином и эозином Микмед-5 (ОАО «ЛОМО», Россия), увеличение  $\times 40$ ).



А – контрольная группа

Б – подопытная группа

Рисунок 5 – Гистологические срезы почек норок в эксперименте (окрашивание гематоксилином и эозином Микмед-5 (ОАО «ЛОМО», Россия), увеличение  $\times 10$ ).

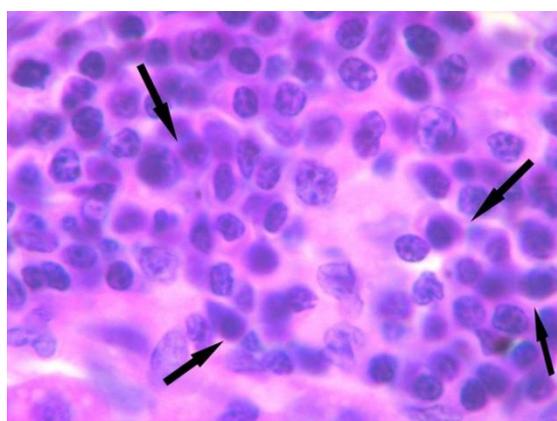


Рисунок 6 – Плазмоциты в печени норок контрольной группы (окрашивание гематоксилином и эозином Микмед-5 (ОАО «ЛОМО», Россия), увеличение  $\times 100$ ).

### 3.4 Биохимическое исследование крови

В результате проведенного биохимического исследования было установлено, что у норок в опыте через один, три и шесть месяцев прослеживалась биохимическая картина изменений, характерных для Алеутской болезни. Данные, представленные в таблице 1 показывают, что через 6 месяцев после применения «Аллокин-альфа» у контрольной группы животных средний показатель общего белка составляет  $97,50 \pm 1,53$  г/л. У подопытных норок, значение общего белка меньше и составляет  $88,30 \pm 1,49$  г/л (при  $p < 0,05$ ). Уменьшение показателя происходит за счет перераспределения белковых фракций и снижения уровня глобулинов в подопытной группе по сравнению с контролем.

Отдельно стоит отметить, что у норок, получавших «Аллокин-альфа» показатель мочевины уменьшился до  $9,08 \pm 3,88$  ммоль/л, что было в 2 раза ниже, чем в группе контроля, где он соответствовал  $18,64 \pm 4,22$  ммоль/л (при  $p < 0,05$ ). Показатель креатинина у подопытных норок также уменьшился в 1,5 раза с  $142,06 \pm 2,62$  мкмоль/л до  $97,71 \pm 1,47$  мкмоль/л (при  $p < 0,05$ ). Активность АЛТ у подопытных особей была в 2 раза ниже и составляла  $130,73 \pm 4,43$  МЕ/л по сравнению  $273,60 \pm 5,84$  МЕ/л у контрольных животных (при  $p < 0,05$ ). У подопытных норок активность АСТ составляло  $184,88 \pm 3,22$  МЕ/л, при этом оставалось в 1,6 раза ниже, чем у контрольных животных, где данное значение соответствовало  $286,60 \pm 3,36$  МЕ/л (при  $p < 0,05$ ).

Таблица 1 – Биохимические показатели крови норок

Показатель, ед. измерения	Показатели клинически здоровых норок**	Группа №1 контроль (n=24 головы)	Группа №2 «Аллокин-альфа» (n=30 голов)
		M±SEM	M±SEM
Общий белок, г/л	72,8	97,50±1,53	88,30±1,49*
Альбумин, г/л	36,9	32,50±0,82	31,60±1,16
Глобулины, г/л	31,0	65,00±0,94	55,43±0,87*
Мочевина, ммоль/л	3,52	18,64±4,22	9,08±3,88*
Креатинин, мкмоль/л	50,9	142,06±2,62	97,71±1,47*
АЛТ, МЕ/л	80,1	273,60±5,84	130,73±4,43*
АСТ, МЕ/л	125,6	286,60±3,36	184,88±3,22*

Примечание. \*Различия в сравнении с контрольной группой статистически значимы при  $p < 0,05$ , \*\*Нормативные показатели приведены согласно данным О.Ю. Беспятовых и соавт.(2011), Ц.Ж. Батоева и соавт.(2013), Н.В. Мантатова и соавт.(2019) для норок 7-8 месячного возраста.

### 3.5 Клинический статус норок в эксперименте

При клиническом осмотре норок контрольной группы отмечали реагирующих норок в 40-45-дневном возрасте. Больные животные были малоподвижны. Реакция на такие внешние раздражители как появление людей у клетки, окрик, стук, раздача кормосмеси снижены. В целом, к окончанию исследования, у животных контрольной группы отмечены признаки недомогания – вялость, сонливость, сниженная реакция. У отдельных особей наблюдали нарушение координации движений. Шерсть у животных из группы контроля взъерошена, волосяной покров тусклый и ломкий. Слизистая оболочка ротовой полости оставалась без изменений на протяжении всего исследования, была блестящая и имела бледно-розовую окраску.

У норок подопытной группы отмечена повышенная подвижность. Телосложение зверей из подопытной группы было крепким и пропорциональным, судороги отсутствовали, статолокомоторный акт не нарушен. Все животные подопытной группы адекватно и энергично реагировали на внешние раздражители, особенно активно проявляли свое поведение при раздаче корма. Наблюдали увеличение густоты меха, при продувке волоса свободных участков кожи не обнаруживали. Волоски были прочными и эластичными. При поглаживании отмечали наличие блеска верхнего яруса волосяного покрова. Окрас равномерный и однотонный по всему телу. Слизистые оболочки ротовой полости также имели блестящую поверхность и бледно-розовую окраску до конца эксперимента.

### 3.6 Исследование зоотехнических показателей

#### 3.6.1 Анализ сохранности норок

Учет сохранности животных проводили в течение всего исследования во всех экспериментальных группах. В контрольной группе норок наблюдали высокую смертность особей по сравнению с подопытной. За весь период эксперимента отход щенков в контрольной группе составил 20%. В группе норок, получавших «Аллокин-альфа», на протяжении всего исследования, не было зафиксировано ни одного случая падежа, что говорит о 100% сохранности в подопытной группе животных.

### 3.6.2 Динамика массы тела норок в эксперименте

Для контроля роста и развития зверей, в обеих группах животных определяли изменение массы тела методом ежемесячного взвешивания. Результаты возрастной динамики массы тела норок представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Возрастная динамика массы тела норок

Возраст, дни	Контрольная группа				Подопытная группа			
	Самки		Самцы		Самки		Самцы	
	п, голов	Средняя масса, г (M±SEM)	п, голов	Средняя масса, г (M±SEM)	п, голов	Средняя масса, г (M±SEM)	п, голов	Средняя масса, г (M±SEM)
30	20	192±5,9	10	207±5,7	20	190±6,1	10	209±5,6
60	20	385,4±6,5	10	638,6±5,9	20	482,2±5,9*	10	677,9±5,8*
90	20	721,3±5,7	10	1136,7±6,4	20	832,7±6,2*	10	1308,1±6,3*
120	19	994,6±8,9	10	1415,6±5,8	20	1117,5±5,7*	10	1723,9±5,6*
150	18	1287,5±7,4	9	2030±5,8	20	1425,2±5,6*	10	2280±6,2*
180	16	1320,6±11,4	8	2250±7,2	20	1580±6,4*	10	2570±5,9*
210	16	1422,2±11,9	8	2345,2±6,6	20	1675,1±6,1*	10	2680,2±5,3

Примечание. \*Различия в сравнении с контрольной группой статистически значимы при  $p < 0,05$ .

Исходя из результатов, представленных в таблице 2 наглядно видно, что в начале опыта, все звери находились в примерно одинаковом весе -  $191 \pm 5,6$  г, однако у норок, получавших «Аллокин-альфа» уже со второго месяца эксперимента стал наблюдаться прирост живой массы. В результате проведенного опыта установлено, что средний вес норок, получавших препарат был выше на 15,1% у самок и на 12,5% у самцов по сравнению с контрольной группой животных.

### 3.7.3 Товарные свойства шкурок

Оценку товарных свойств шкурок, полученных от норок в эксперименте, проводили путем определения средней площади шкурок с помощью показателей длины от междуглазья до корня хвоста и удвоенной ширины шкурки с использованием измерительной ленты. Показатели промеров тела норок и средняя площадь полученных шкурок представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Средние показатели промеров тела норок сравниваемых групп

Показатель	Контрольная группа		Подопытная группа	
	Самки (n=16)	Самцы (n=8)	Самки (n=20)	Самцы (n=10)
Длина от междуглазья до корня хвоста, см M±SEM	43,2±0,08	48,8±0,12	45,1±0,09*	53,2±0,14*
Средняя площадь шкурок, см <sup>2</sup> M±SEM	920,8±4,4	1131,1±4,1	1041,7±4,4*	1247,8±4,1*

Примечание. \*Различия в сравнении с контрольной группой статистически значимы при  $p < 0,05$

Анализируя полученные данные, можно сделать вывод, что применение «Аллокин-альфа» больным вирусным плазмодитозом норкам, способствовало увеличению размера полученных от них шкурок в среднем на  $1,21 \text{ дм}^2$  от самок и  $1,16 \text{ дм}^2$  от самцов, что ведет к

увеличению их стоимости и повышению рентабельности производства.

#### **4. Заключение**

1. Отечественный индуктор интерферона «Аллокин-альфа» эффективен для профилактики Алеутской болезни норок.

2. В результате проведенного мониторинга, на территории звероводческого хозяйства в Северо-Западном регионе Российской Федерации установлена циркуляция возбудителя Алеутской болезни норок.

3. ПЦР-диагностика с электрофоретической детекцией не выявила ДНК возбудителя вирусного плазмозитоза у 40% подопытных норок через 6 месяцев после применения препарата «Аллокин-альфа».

4. Применение препарата «Аллокин-альфа» при Алеутской болезни, позволило снизить интенсивность морфофункциональных изменений органов больных норок. Наблюдались невысокая степень плазмодитарной инфильтрации, полнокровие кровеносных сосудов, отсутствие очагов кровоизлияний, низкая степень апоптоза ооцитов, в то время как в контрольной группе отмечались тяжелые поражения.

5. На фоне применения препарата «Аллокин-альфа» больным Алеутской болезнью норкам, достоверно в 2 раза уменьшается уровень мочевины, в 1,5 раза креатинина, в 2 раза активность АЛТ и 1,6 раз активность АСТ, что может указывать на меньшие масштабы деструктивных изменений в почках и печени, играющих решающую роль в исходе болезни.

6. Препарат «Аллокин-альфа» показал высокую клиническую эффективность при Алеутской болезни норок, что позволило предупредить развитие клинической картины, снизить до минимума смертность животных, а также обеспечило положительное воздействие на размеры получаемых шкур, что способствует повышению стоимости заготавливаемой продукции.

7. Разработанная схема профилактических мероприятий при вирусном плазмозитозе с применением препарата «Аллокин-альфа» норкам в возрасте 30 дней, подкожно, в дозе 0,5 мг на животное двукратно с интервалом 6 дней доказала свою эффективность.

#### **5. Практические предложения**

Основные научные положения работы и ее практические результаты рекомендуется использовать на звероводческих предприятиях ветеринарным специалистам, в учебном процессе со студентами, аспирантами, научными работниками, а также на курсах повышения квалификации и переподготовки кадрового состава зоотехнического и ветеринарного профиля.

Предложенная схема применения, ранее не используемого в звероводстве индуктора интерферона «Аллокин-альфа», характеризуется наиболее высоким уровнем эффективности из существующих методов борьбы с Алеутской болезнью, обеспечивает регрессирование темпов развития вирусного плазмозитоза и снижение его негативного воздействия на качество и количество получаемой продукции, повышая рентабельность производства.

Рекомендуемый отечественный индуктор интерферона «Аллокин-альфа», а также разработанная и испытанная схема применения препарата, защищенная патентом, доказали свою эффективность и могут быть использованы в практической работе ветеринарных специалистов в рамках плана диагностических исследований, ветеринарно-профилактических и противоэпизоотических мероприятий в звероводческих хозяйствах всех форм собственности на территории субъектов Российской Федерации. Препарат рекомендуется применять молодняку норок 30-дневного возраста в дозе 0,5 мг на животное двукратно с интервалом 6 дней.

#### **6. Перспективы дальнейшей разработки темы**

Полученные данные позволяют высоко оценить эффективность применения препарата «Аллокин-альфа» при Алеутской болезни норок. Предложенные в диссертации теоретические и

практические подходы следует внедрять в ветеринарную практику повсеместно, что позволит открыть перспективу дальнейшего расширения линейки противовирусных средств и способов лечения вирусных болезней животных. Результаты настоящего исследования позволяют в дальнейшем проводить широкие производственные испытания исследуемого препарата «Аллокин-альфа» в отношении различных болезней вирусной этиологии других видов продуктивных и непродуктивных животных, в том числе болезней, методов борьбы с которыми, до сих пор не разработано. Поэтому разработку данных тем мы считаем перспективной.

## **7. Список работ, опубликованных по теме диссертации**

### ***Статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:***

1. Алеутская болезнь норок: эффективность иммунокорректирующей терапии / А. Сухинин, М. Гумберидзе, С. Макавчик [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2022. – Т. 57. – № 2. С. 384-397. – DOI: 10.15389/agrobiology.2022.2.384rus.
2. Сухинин, А. А. Диагностика Алеутской болезни норок с использованием молекулярно-генетического метода / А. А. Сухинин, М. М. Гумберидзе, Е. И. Приходько, О. С. Сулян [и др.] // Международный вестник ветеринарии. – 2022. – № 1. – С. 32 – 36. – DOI 10.52419/issn2072-2419.2022.1.32.
3. Сухинин, А. А. Биохимическая картина крови больных алеутской болезнью норок под действием аллоферона / А. А. Сухинин, М. М. Гумберидзе // Международный вестник ветеринарии. – 2022. – №4. – С. 42-47. – DOI 10.52419/ISSN2072-2419.2022.4.42.
4. Оценка морфологических изменений внутренних органов при терапии Алеутской болезни норок аллофероном / А. Сухинин, М. Гумберидзе, Б. Никонов, [и др.] // Международный вестник ветеринарии. – 2021. – № 4. – С. 41-45. – DOI 10.52419/issn2072-2419.2021.4.41.

### ***Статьи, опубликованные в сборниках материалов конференций:***

5. Гумберидзе, М.М. Опыт применения индукторов интерферона при Алеутской болезни норок / М.М. Гумберидзе, А.А. Сухинин // Материалы международной научно-практической конференции «Современные проблемы природопользования, охотоведения и звероводства» / Всероссийский научно-исследовательский институт охотничьего хозяйства и звероводства им. проф. Б.М. Житкова РАСХН. – Киров. – 2022. – С. 20–24.
6. Гумберидзе, М.М. Опыт применения аллоферона при Алеутской болезни норок / М.М. Гумберидзе, А.А. Сухинин // Материалы международной научно-практической конференции «Инновационные решения актуальных вопросов биобезопасности» / Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности. – Казань. – 2022.
7. Гумберидзе, М. М. Влияние аллоферона на показатели привеса норок больных Алеутской болезнью / М. М. Гумберидзе, А. А. Сухинин // Материалы X юбилейной международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны» / Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины. – Санкт-Петербург, 2021. – С. 89-90.
8. Гумберидзе, М. М. Влияние противовирусного препарата «Аллокин – альфа» на биохимические показатели крови норок при Алеутской болезни (*morbus aleutica lutreolarum*) / М. М. Гумберидзе, А. А. Сухинин // Материалы 75-й юбилейной международной научной конференции молодых ученых и студентов СПбГУВМ / Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины. – Санкт-Петербург, 2021. – С. 44-46.

***Патенты:***

9. Патент № 2742160 Российская Федерация, МПК А61К 35/64 (2015.01), А61К 38/04 (2006.01), А61Р 31/12 (2006.01), А61Р 37/02 (2006.01). Способ лечения Алеутской болезни норки: № 2020119743: заявл. 2020.09.13: опубл. 02.02.2021, Бюл. № 4 / А. А. Сухинин, М. М. Гумберидзе, Б. А. Никонов, В. И. Гусев, И. В. Евсегнеева, Г. П. Беккер. - 12 с.