

9. Primenenie biotinilirovannogo proizvodnogo okislennogo dekstrana dlia profilaktiki infektsionnykh boleznei teliat / V.lu. Koptev, N.A. Shkil, M.A. Leonova, N.lu. Balybina, I.N. Penkova, I.S. Onishchenko // Veterinariia. – 2021. – No. 8. – S. 11-13.

10. Fedorenko, T.V. Izmenenie fagotsitarnoi aktivnosti neitrofilov pri primenenii preparatov endogennoogo proiskhozhdeniia / T.V. Fedorenko // Agropromyshlenni kompleks: problemy i perspektivy razvitiia. Materialy Verossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii. – Blagoveshchensk, 2023. – S. 131-137.

11. Patent No. 2 804 191(13) C1. Sposob vydeleniia syvorotochnykh belkov iz moloziva korov: zaiav. No. 2023104244 ot 27.02.2023; opubl. 26.09.2023 / Z.A. Litvinova, N.M. Mandro; zaiavitel Dalnevostochnyi GAU. – 2 s.

12. Patent No. 2802057 C1. Sposob vydeleniia peptidov iz gidrolizata otkhodov ot farmatsevticheskoi pererabotki pantov olenei: zaiavl.

No. 2023104247 ot 27.02.2023; opubl. 22.08.2023 / Z.A. Litvinova, N.M. Mandro; zaiavitel Dalnevostochnyi GAU. – 2 s.

13. Abramov, S.S. Metodicheskie ukazaniia po opredeleniiu estestvennoi rezistentnosti i putiakh ee povysheniia u molodniaka selskokhoziaistvennykh zhivotnykh / S.S. Abramov, A.F. Mogilenko, A.I. Iatusevich; Vitebskii vet. in-t. – Vitebsk, 1989. – S. 16-20.

14. Dorofeichuk, V.G. Opredelenie aktivnosti lizotsima nefelometricheskim metodom / V.G. Dorofeichuk // Laboratornoe delo. – 1963. – No. 1. – S. 15.

15. Ivanova, A.M. Metodiki opredeleniia poglotitelnoi i perevarivaiushchei sposobnosti neitrofilov / A.M. Ivanova, B.A. Chukhlovin // Laboratornoe delo. – 1967. – No. 10. – S. 610-614.

16. Immunologiya: ucheb. posobie / P.A. Krasochko [i dr.]; pod red. P.A. Krasochko, N.D. Lisova. – Mn.: Aversev, 2005. – 128 s.



УДК 619:616-097:578.828.11

DOI: 10.53083/1996-4277-2024-233-3-46-52

**М.Е. Горбунова, Р.И. Шангараев,
Н.А. Фахрутдинов, В.Г. Гумеров, В.В. Евстифеев,
Н.И. Хаммадов, К.В. Усольцев
M.E. Gorbunova, R.I. Shangaraev,
N.A. Fakhrutdinov, V.G. Gumerov, V.V. Evstifeev,
N.I. Khammadox, K.V. Usoltsev**

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СИНТЕТИЧЕСКОГО АНТИГЕНА НА ОСНОВЕ ИММУНОГЕННОГО ЭПИТОПА GP51 ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

DIAGNOSTIC PROPERTIES OF A SYNTHETIC ANTIGEN BASED ON THE IMMUNOGENIC EPITOPE GP51 OF THE BOVINE LEUKEMIA VIRUS

Ключевые слова: крупный рогатый скот, вирус лейкоза, сыворотка, антиген, антитела, белок, эпитоп, gp51, синтетический пептид, иммуноферментный анализ.

Диагностика лейкоза остается одной из ключевых проблем при проведении оздоровительных мероприятий в неблагополучных по данному заболеванию хозяйствах. Представлены разработка и изучение диагностических свойств синтетического пептида, представляющего собой аминокислотную последовательность эпитопов белка gp51 вируса лейкоза, в качестве антигена для ИФА при индикации данного возбудителя. По результатам сравнительного анализа иммуногенности эпитопов вирусных белков gp51, gp30 и p24 был

отобран наиболее иммуногенный вариант – аминокислотная последовательность белка gp51 в позиции от 131 до 163 aa. На основе выбранной аминокислотной последовательности сконструирован синтетический пептид BLV_{per}, который характеризовался оптимальными физико-химическими показателями (растворимость, расчётные значения pH и изоэлектрической точки молекулы). При определении диагностических характеристик представленного выше пептида было установлено, что при использовании соответствующих конъюгатов BLV_{per} дифференцирует положительные сыворотки от BLV-отрицательных, а также сывороток крови здоровых и больных животных (кролика, овцы, козы, мыши, коз, больных артрит-энцефалитом (CAEV), и кошек, зараженных лейкозом (FeLV)). При определе-

нии чувствительности способа ИФА на основе BLVпер специфические антитела в положительных образцах выявлялись в разведении 1:1600. При исследовании 90 проб сывороток крови крупного рогатого скота продемонстрировано полное совпадение результатов ИФА на основе синтетического пептида и коммерческого набора. По результатам проведенного исследования показана возможность применения синтетического пептида BLVпер в диагностических серологических тестах.

Keywords: *cattle, leukemia virus, serum, antigen, antibodies, protein, epitope, gp51, synthetic peptide, enzyme-linked immunosorbent assay.*

Diagnosis of leukemia remains one of the key problems in carrying out recreational activities on farms that are disadvantaged by this disease. This work refers to development and study of the diagnostic properties of a synthetic peptide which is an amino acid sequence of epitopes of the gp51 protein of the leukemia virus as an antigen for ELISA in the indication of this pathogen. Based on the results of a comparative analysis of the immunogenicity of epitopes of

the viral proteins gp51, gp30 and p24, the most immunogenic variant was selected - the amino acid sequence of the gp51 protein in positions from 131 to 163 aa. Based on the selected amino acid sequence, a synthetic peptide BLVper was constructed which was characterized by optimal physicochemical parameters (solubility, calculated pH values and isoelectric point of the molecule). When determining the diagnostic characteristics of the peptide presented above, it was found that when using appropriate conjugates, BLVper differentiates positive sera from BLV-negative as well as blood sera of healthy and sick animals (rabbit, sheep, goat, mouse, goats with arthritis encephalitis (CAEV) and cats infected with leukemia (FeLV)). When determining the sensitivity of the ELISA method based on BLVper, specific antibodies in positive samples were detected at a dilution of 1:1600. In the study of 90 samples of bovine blood sera, a complete coincidence of the results of ELISA based on a synthetic peptide and a commercial kit was demonstrated. According to the results of the study, the possibility of using the synthetic peptide BLVper in diagnostic serological tests is shown.

Горбунова Мария Евгеньевна, мл. науч. сотр., ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань, Российская Федерация, e-mail: maria.metax@bk.ru.

Шангараев Рафкат Искандарович, к.в.н., науч. сотр., ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань, Российская Федерация, e-mail: rafkat.shangaraev@mail.ru.

Фахрутдинов Наиль Анисович, мл. науч. сотр., ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань, Российская Федерация, e-mail: siam93@mail.ru.

Гумеров Вали Галиевич, д.в.н., вед. науч. сотр., ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань, Российская Федерация, e-mail: gumerowali@mail.ru.

Евстифеев Виталий Валерьевич, д.б.н., гл. науч. сотр., ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань, Российская Федерация, e-mail: evstifeev@vnivi.ru.

Хаммадов Наиль Ильдарович, к.б.н., вед. науч. сотр., ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань, Российская Федерация, e-mail: nikhammadov@mail.ru.

Усольцев Константин Валерьевич, к.в.н., вед. науч. сотр., ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань, Российская Федерация, e-mail: ukv3@mail.ru.

Gorbunova Mariya Evgenevna, Junior Researcher, Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation, e-mail: maria.metax@bk.ru.

Shangaraev Rafkat Iskandarovich, Cand. Vet. Sci., Researcher, Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation, e-mail: rafkat.shangaraev@mail.ru.

Fakhrutdinov Nail Anisovich, Junior Researcher, Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation, e-mail: siam93@mail.ru.

Gumerov Vali Galievich, Dr. Vet. Sci., Leading Researcher, Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation, e-mail: gumerowali@mail.ru.

Evstifeev Vitaliy Valerevich, Dr. Vet. Sci., Chief Researcher, Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation, e-mail: evstifeev@vnivi.ru.

Khammadov Nail Ildarovich, Cand. Bio. Sci., Leading Researcher, Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation, e-mail: nikhammadov@mail.ru.

Usoltsev Konstantin Valerevich, Cand. Vet. Sci., Leading Researcher, Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation, e-mail: ukv3@mail.ru.

Введение

Лейкоз крупного рогатого скота (КРС) – хроническая инфекционная болезнь опухолевой природы, протекающая бессимптомно или характеризующаяся лимфоцитозом и злокаче-

ственным разрастанием кроветворных и лимфоидных клеток в различных органах [1].

Возбудителем лейкоза является вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛ КРС, BLV), который относится к семейству *Retroviridae*, роду *Deltaretrovirus*. Согласно классификации между-

народного эпизоотического бюро (МЭБ), лейкоз КРС входит в категорию наиболее распространенных инфекционных болезней. Эпизоотическая ситуация по данной инфекции в Российской Федерации, как и в Республике Татарстан, характеризуется эндемичностью [2].

Экономический ущерб от лейкоза крупного рогатого скота обусловлен снижением показателей продуктивности, выбраковкой животных с высокими показателями удоя, потерей ценного генофонда и дополнительными затратами на выполнение ветеринарных правил [3].

В России исследования на лейкоз проводят, применяя следующие методики: анализ гематологических показателей, серологические реакции (иммунодиффузия (РИД), иммуноферментный анализ (ИФА)) и полимеразную цепную реакцию (ПЦР) [4]. Согласно стандартам МЭБ двумя основными прижизненными методами индикации лейкоза крупного рогатого скота являются серологические (РИД и ИФА). По данным литературы, установлено, что за последнее десятилетие для серологической диагностики разработаны различные варианты серологических тестов на основе рекомбинантного gp51 белка вируса лейкоза [5], рекомбинантного p24 антигена [6]. Однако широкое распространение получили иммуноферментные тест-системы на основе цельного антигена gp51 (или его фрагментов) и специфических к нему моноклональных антител. Преимущество использования gp51 антигена ВЛ КРС связано с тем, что в период инфекционного процесса специфические антитела к gp51 появляются раньше, чем к p24 антигену, следовательно, концентрация антител к gp51 антигену в сыворотке крови больных животных выше [7]. Антигены gp51 и p24 в основном выращивают и получают из культур клеток почек эмбриона овцы (FLK), хронически инфицированных вирусом [6]. Однако выделение и очистка вируса из клеток FLK требуют соответствующей квалификации специалистов [8], кроме того, процесс производства достаточно трудоемок.

На сегодняшний день для разработки серологических тест-систем начали использоваться синтетические антигены, которые обладают некоторыми преимуществами по сравнению с антигенными компонентами, полученными на культурах клеток, среди которых: высокая специфичность, физико-химическая стабильность, возможность использования большего разнооб-

разия потенциальных мишеней, адаптация материала полимера под конкретные задачи [6, 7]. Синтетические пептиды имитируют иммунодоминантные эпитопы антигена возбудителя [7]. Таким образом, использование синтетических антигенов является перспективным направлением в серологической диагностике инфекционных болезней животных, в том числе методом ИФА.

Целью работы являлись разработка и исследование антигенных свойств синтетического пептида, состоящего из участков аминокислотных последовательностей антигенных эпитопов белка gp51 ВЛ КРС.

Объекты и методы

Поиск аминокислотных последовательностей и биоинформационный анализ эпитопов белков вириона ВЛ КРС осуществляли с помощью ресурсов «ImmuneEpitopeDatabase», BLASTp, PerCalc. Синтез пептида заказывали в AlphaDiagnosticIntl. Inc. (США), импортёр ООО «Русмедторг» (Россия).

В работе использовали: сыворотку крови КРС (n=90), для которых ранее было подтверждено наличие/отсутствие антител к возбудителю лейкоза методами РИД и ИФА [9]; сыворотку крови здоровых животных (кролик, овца, коза и мышь); сыворотку крови козы, зараженной вирусом артрит-энцефалита коз (CAEV) по данным ПЦР [10] и ИФА (с использованием набора реагентов MVV/CAEV p28 Ab Screening («IDEXX», Франция); сыворотку крови кошки, инфицированной вирусом кошачьего лейкоза (FeLV) (иммунологический статус установлен по результатам диагностических исследований ветеринарной клиники). В качестве положительного контрольного образца (ПКО) и отрицательного контрольного образца (ОКО) использовали сыворотки крови крупного рогатого скота, для которых ранее было подтверждено наличие/отсутствие антител к возбудителю лейкоза методами РИД и ИФА, а также дополнительно было проведено исследование крови от тех же животных на наличие/отсутствие провирусной ДНК методом ПЦР [9, 11].

В работе использовали конъюгат против IgG крупного рогатого скота, кролика, овцы, козы и мыши («Имрек», Россия).

Для проведения иммуноферментного анализа с использованием синтетических пептидов применяли непрямой вариант ИФА. В испытании

были использованы планшеты ВНИИ Медполимер (Россия), на который наносили антиген в концентрации 1 мкг/мл в объеме 200 мкл на лунку и инкубировали при температуре от 2 до 8°C в течение 16 ч. Содержимое ячеек удаляли и отмывали один раз ФСБ (рН7,3) с добавлением 0,5% Твин-20 (ФСБ-Т). После чего в каждую лунку планшета вносили по 200 мкл блокирующего белка (3% сухое молоко) и инкубировали при температуре 37°C в течение 2 ч. Содержимое ячеек планшета аспирировали и проводили промывку раствором ФСБ-Т один раз. Во все лунки сенсibilизированного планшета вносили по 100 мкл ФСБ (рН7,3) и 5 мкл сывороток. В две лунки (А1 и В1) вносили по 5 мкл ОКО, в две лунки (G8 и H8) – 5 мкл ПКО. Планшет накрывали крышкой и выдерживали 45 мин. при температуре 37°C. Содержимое лунок планшета аспирировали и проводили отмывку раствором ФСБ-Т три раза. Во все задействованные лунки планшета вносили по 100 мкл конъюгата в титре 1:40000. Планшет инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Содержимое ячеек планшета аспирировали и осуществляли отмывку раствором ФСБ-Т три раза. Во все лунки планшета вносили по 100 мкл субстратной смеси (тетраметилбензидин гидрохлорид (ТМБ)). Планшет выдерживали в темном месте при комнатной температуре (22±5°C) 10 мин. Взаимодействие субстрата останавливали раствором 1М серной кислоты, который вносили в каждую ячейку планшета по 50 мкл, и осуществляли учет результатов ИФА (при длине волны 450 нм) на спектрофотометре Multiskan GO (ThermoFisher, США). Расчёт ре-

зультата реакции осуществляли согласно формуле:

$$P = \frac{OP \text{ исслед. образца}}{OP \text{ око}}$$

Анализ считался положительным, если коэффициент отношения оптической плотности (ОП) исследуемой сыворотки к ОП отрицательного образца больше или равен 2,2; сомнительным, если коэффициент отношения ОП исследуемой сыворотки к ОП отрицательному образцу от 2,0 до 2,2; отрицательным, если коэффициент отношения ОП исследуемой сыворотки к ОП отрицательному образцу меньше 2,0.

Результаты исследований их обсуждения

Для разработки синтетических пептидов с помощью биоинформационного анализа нами были отобраны наиболее иммуногенные эпитопы вирусных белков gp51, gp30 и p24 ВЛ КРС. В таблице представлено количество иммуногенных эпитопов основных антигенов ВЛ КРС.

По результатам биоинформационного анализа иммуногенных эпитопов ВЛ КРС было установлено, что наиболее активным является белок gp51. Таким образом, для дальнейшей работы использовали эпитопы белка gp51, характеризующегося Т-клеточным иммунным ответом, расположенным в позиции от 131 до 163 aa. Для максимального сходства разрабатываемого пептида с нативным антигеном вируса лейкоза применяли цельную аминокислотную последовательность – N-конец DQGSFYVNHQILFLHLKQCHGIFLTWEIW конец-С, соответствующую указанной выше иммуногенной области.

Таблица

Иммуногенные эпитопы полипептидов вируса лейкоза крупного рогатого скота

Антиген	Количество иммуногенных эпитопов	Иммунный ответ	
		Т-клеточный	В-клеточный
gp51	71	45	118
gp30	14	15	9
p24	53	5	48

Представленная аминокислотная последовательность была проанализирована на пептидном калькуляторе для определения её физических характеристик. Анализируемая последовательность характеризовалась нулевой изоэлектрической точкой при рН6,34. Для улучшения физических свойств пептида, обозначенного нами BLVper, была произведена его модификация с добавлением гидрофильных и имеющих положительный заряд аминокислот, таких как

аспарагин (N), цистеин (C), лизин (K), тирозин (Y), серин (S), глутамин (Q), глицин (G). В результате изменения пептид приобрёл аминокислотную последовательность: N-конец NCKYSNQC GDQGSFYVNHQILFLHLKQCHGIFLTWEIWNС конец-С со следующими физическими показателями: нулевой изоэлектрической точкой при рН7,01, при нейтральной рН заряд белковой молекулы составляет 0 ед., молеку-

лярная масса – 4,89 кДа, коэффициент экстинкции равен $13940 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

По результатам BLAST-анализа установлено, что аминокислотная последовательность синтетического пептида BLVпер является специфичной только для возбудителя лейкоза крупного рогатого скота.

Анализ антигенных характеристик полученного синтетического пептида выполнили с применением сывороток крови: условно здоровых животных (кролик, овца, коза и мышь), козы, инфицированной вирусом артрит-энцефалита коз (CAEV), кошки, зараженной вирусом кошачьего лейкоза (FeLV), а также ОКО и ПКО. Взаимодействие образцов с синтетическим пептидом исследовали методом ИФА в непрямом формате в трех повторях. Все пробы ПКО при взаимодействии с пептидом BLVпер были положительными. Средняя величина оптической плотности (ОП) ПКО составила $1,89 \pm 0,19$, ОКО – $0,513 \pm 0,02$. Коэффициент отношения ОП отрицательного и контрольного образцов был равен 3,68 ед. В образцах от здоровых животных, а также зараженных CAEV и FeLV, специфических антител к BLVпер обнаружено не было. Среднее значение ОП находилось в пределах от $0,185 \pm 0,02$ до $0,2 \pm 0,01$. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о специфичности полученного синтетического пептида и отсутствии перекрестной реакции с маркерами инфицирования возбудителями других близкородственных ретровирусов.

Для определения минимального титра противовирусных антител к ВЛ КРС в исследуемых пробах были проанализированы шесть положительных сывороток крови крупного рогатого скота в трех повторях. При определении анализируемого показателя каждый образец был разтитрован, начиная с 1:100 и заканчивая разведением 1:12800. В результате эксперимента установлено, что минимальный титр антител к ВЛ КРС, выявляемый в исследуемых сыворотках крови с помощью ИФА, составляет 1:1600.

Для определения диагностической чувствительности синтетического пептида BLVпер в работе использовали 90 сывороток крови КРС (42 – отрицательных, 48 – положительных). Результаты, полученные при исследовании сывороток способом ИФА на основе синтетического пептида, полностью совпадали с результатами параллельно проведенного анализа с использованием коммерческой тест-системы [9]. Таким

образом, диагностическая чувствительность синтетического пептида составила 100%.

Заключение

В результате анализа иммуногенных эпитопов gp51 ВЛ КРС выполнен дизайн синтетического пептида для определения антител к возбудителю лейкоза крупного рогатого скота. Разработанный пептид характеризовался оптимальными физико-химическими показателями (растворимость, расчётные значения рН и изоэлектрической точки молекулы). При определении диагностических свойств анализируемого пептида было выявлено, что BLVпер дифференцирует сыворотки крови крупного рогатого скота с различным статусом по содержанию антител против лейкоза. При определении чувствительности способа ИФА на основе анализируемого пептида (BLVпер) установлено, что минимальный выявляемый титр антител к ВЛ КРС, в тестируемых образцах, составляет 1:1600. По результатам выполненного исследования установлено полное совпадение результатов ИФА на основе синтетического пептида и коммерческого набора. Представленный в работе синтетический пептид может быть использован как антиген при создании тест-системы для выявления возбудителя лейкоза крупного рогатого скота, что найдет широкое применение в ветеринарной практике для серологической диагностики.

Библиографический список

1. Молекулярно-генетическая характеристика изолятов вируса лейкоза крупного рогатого скота, идентифицированных в Камско-Устьинском районе Республики Татарстан / М. Е. Семёнова, Т. Х. Фаизов, К. В. Усольцев [и др.] – Текст: непосредственный // Ветеринарный врач. – 2014. – № 1. – С. 29-32.
2. Мониторинг эпизоотической ситуации лейкоза крупного рогатого скота в Республике Татарстан с применением молекулярно-генетических и серологических методов диагностики / Р. И. Шангараев, М. Е. Горбунова, Р. Ф. Сафина [и др.] – DOI 10.53083/1996-4277-2023-219-1-58-64. – Текст: непосредственный // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2023. – № 1 (219). – С. 58-64.
3. Структура геномов (фенотип популяций), доминирующих на территории УрФО генетических групп возбудителя лейкоза крупного рогатого скота / И. М. Донник, А. П. Порываева,

М. В. Петропавловский [и др.]. – DOI 10.33632/1998-698X_2023_5_30. – Текст: непосредственный // Ветеринарный врач. – 2023. – № 5. – С. 30-36.

4. Горбунова, М. Е. Разработка системы генетического типирования вируса лейкоза крупного рогатого скота: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук: 4.2.3 – инфекционные болезни и иммунология животных / Горбунова Мария Евгеньевна – Уфа, 2023. – 20 с. – URL: https://www.bsau.ru/upload/iblock/c50/Автореферат_Горбунова%20М.Е..pdf –Текст: электронный.

5. De Giuseppe, A., Feliziani, F., Rutili, D., De Mia, G. M. (2004). Expression of the bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51) by recombinant baculovirus and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11 (1), 147–151. <https://doi.org/10.1128/cdli.11.1.147-151.2004>.

6. Современные аспекты серологической диагностики энзоотического лейкоза крупного рогатого скота / К. Н. Мукантаев, К. К. Муканов, А. В. Шустов [и др.] – Текст: непосредственный // Биотехнология. Теория и практика. – 2012. – № 3. – С. 3-15.

7. Soutullo, A., García, M. I., Bailat, A., et al. (2005). Antibodies and PMBC from EIAV infected carrier horses recognize gp45 and p26 synthetic peptides. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108(3-4), 335–343. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.06.007>.

8. Получение рекомбинантного белкового фрагмента gp51 антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота, экспрессированного в E.coli без тиоредоксиновой вставки / К. Н. Мукантаев, А. В. Шустов, Ы. Сыдыкнаби [и др.] – Текст: непосредственный // Биотехнология. Теория и практика. – 2014. – № 1. – С. 49-56.

9. Gorbunova, M.E., Safina, R.F., Usoltsev, K.V., et al. (2022). A New Approach to the Diagnosis of Enzoitic Leukosis by Genetic Markers of Bovine Leukemia Virus. *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 12 (4): 4448-4462. DOI: <https://doi.org/10.33263/BRIAC124.44484462>.

10. Лукманова, Г. Р. Индикация вируса артрита-энцефалита коз в ПЦР-РВ и поиск генетических маркеров / Г. Р. Лукманова – Текст: непосредственный // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. – 2020. – Т. 242, № 2. – С. 97-101.

11. Горбунова, М. Е. Разработка способа экспресс диагностики лейкоза крупного рогатого скота, основанного на обнаружении гена нуклеокапсидного белка р24 методом ПЦР в режиме реального времени / М. Е. Горбунова – Текст: непосредственный // Ветеринарный врач. – 2016. – № 6. – С. 3-7.

References

1. Molekuliarno-geneticheskaia kharakteristika izoliatov virusa leikoza krupnogo rogatogo skota, identifirovannykh v Kamsko-Ustinskoy raione Respubliki Tatarstan / M.E. Semenova, T.Kh. Faizov, K.V. Usoltsev [i dr.] // Veterinarnyi vrach. – 2014. – No. 1. – S. 29-32.

2. Monitoring epizooticheskoi situatsii leikoza krupnogo rogatogo skota v Respublike Tatarstan s primeneniem molekuliarno-geneticheskikh i serologicheskikh metodov diagnostiki / R.I. Shangaraev, M.E. Gorbunova, R.F. Safina [i dr.] // Vestnik Altayskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – 2023. – No. 1 (219). – S. 58-64.

3. Struktura genomov (fenotip populatsii), dominiruyushchikh na territorii UrFO geneticheskikh grupp vzbuditelia leikoza krupnogo rogatogo skota / I.M. Donnik, A.P. Poryvaeva, M.V. Petropavlovskii [i dr.] // Veterinarnyi vrach. – 2023. – No. 5. – S. 30-36. DOI 10.33632/1998-698X_2023_5_30.

4. Gorbunova, M.E. Razrabotka sistemy geneticheskogo tipirovaniia virusa leikoza krupnogo rogatogo skota: avtoref. na soisk. uchenoi step. kand. biol. nauk: 4.2.3 – infektsionnye bolezni i immunologiya zhivotnykh Ufa, 2023. 20 s. URL: https://www.bsau.ru/upload/iblock/c50/Avtoreferat_Gorbunova%20M.E..pdf.

5. De Giuseppe, A., Feliziani, F., Rutili, D., De Mia, G. M. (2004). Expression of the bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51) by recombinant baculovirus and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11 (1), 147–151. <https://doi.org/10.1128/cdli.11.1.147-151.2004>.

6. Sovremennye aspekty serologicheskoi diagnostiki enzooticheskogo leikoza krupnogo rogatogo skota / K.N. Mukantaev, K.K. Mukanov, A.V. Shustov [i dr.] // Biotekhnologiya. Teoriia i praktika. – 2012. – No. 3. – S. 3-15.

7. Soutullo, A., García, M. I., Bailat, A., et al. (2005). Antibodies and PMBC from EIAV infected carrier horses recognize gp45 and p26 synthetic peptides. *Veterinary Immunology and Immuno-*

pathology, 108(3-4), 335–343.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.06.007>.

8. Poluchenie rekombinantnogo belkovogo fragmenta gp51 antigena virusa leukoza krupnogo rogatogo skota, ekspressirovannogo v *E. coli* bez tioredoksinovoi vstavki / K.N. Mukantaev, A.V. Shustov, Y. Sydyknabi [i dr.] // *Biotekhnologiya. Teoriia i praktika*. – 2014. – No. 1. – S. 49-56.

9. Gorbunova, M.E., Safina, R.F., Usoltcev, K.V., et al. (2022). A New Approach to the Diagnosis of Enzootic Leukosis by Genetic Markers of Bovine Leukemia Virus. *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 12 (4): 4448-4462. DOI: <https://doi.org/10.33263/BRIAC124.44484462>.

10. Lukmanova, G.R. Indikatsiia virusa artrit-entsefalita koz v PTsR-RV i poisk geneticheskikh markerov / G.R. Lukmanova // *Uchenye zapiski Kazanskoi gosudarstvennoi akademii veterinarnoi meditsiny im. N.E. Baumana*. – 2020. – T. 242. – No. 2. – S. 97-101.

11. Gorbunova, M.E. Razrabotka sposoba ekspress diagnostiki leukoza krupnogo rogatogo skota, osnovannogo na obnaruzhenii gena nukleokapsidnogo belka r24 metodom PTsR v rezhime realnogo vremeni / M.E. Gorbunova // *Veterinarnyi vrach*. 2016. – No. 6. – S. 3-7.



УДК 619:617.711/713-002.636.9
 DOI: 10.53083/1996-4277-2024-233-3-52-56

В.Г. Шипилов, Л.Ф. Сотникова
 V.G. Shipilov, L.F. Sotnikova

ФАКТОРЫ, СПОСОБСТВУЮЩИЕ ВОЗНИКНОВЕНИЮ И РАЗВИТИЮ У МЕЛКИХ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ РАСПЛАВЛЕНИЯ РОГОВИЦЫ (КЕРАТОЛИЗИСА)

FACTORS CONTRIBUTING TO THE OCCURRENCE AND DEVELOPMENT OF CORNEAL MELTDOWN (KERATOLYSIS) IN SMALL PETS

Ключевые слова: *мелкие домашние животные, кератолизис, роговица, кератопии, слезопродукция, тест Ширмера, проба по Норну, общая слезопродукция, прекорнеальная слезная пленка, флуорисцеиновый тест.*

Кератолизис (расплавление роговицы) – неотложное воспалительно-инфицированное состояние, которое сопровождается вовлечением в патологический процесс всех слоев роговицы. Одним из главных и фатальных для глазного яблока осложнений является перфорация роговицы по причине расплавления ее материала (коллагена I и IV типов). Несмотря на имеющиеся исследования в области диагностики и лечения животных с кератолизисом, до настоящего времени в отечественной офтальмологии отсутствуют научно обоснованные данные, касающиеся возникновения и развития данного заболевания. Представлены факторы риска возникновения и развития аутоиммунного кератолизиса у мелких домашних животных, показана роль физиологических барьеров глазного яблока (прекорнеальная слезная пленка, показатели общей слезопродукции) в патогенезе развития заболевания. Представлена породная, видовая, половая принадлежность, а также влияние места локализации язвенного процесса в развитии патологического процесса. Выявлено, что чаще всего болеют собаки и кошки брахицефальных пород старше 9 лет с центральным расположением патологического процесса (длительно не заживающая

язва). На основании использования функционального тестирования и витальных красителей выявлено снижение функции физиологических барьеров переднего отрезка глаза, выражающееся в снижении общей слезопродукции и нарушении эпителиального барьера, являющегося показателем нарушения обменных процессов в роговице и накопления недоокисленных продуктов, протеолитических ферментов в конъюнктивальной полости и на поверхности роговицы. Несмотря на острые клинические признаки (глубокое помутнение и обширное нарушение целостности роговицы), выявлены гипофункция бокаловидных клеток конъюнктивы, снижение слезопродукции, отсутствие прекорнеальной слезной пленки и разрушение эпителиально-эндотелиального барьера.

Keywords: *small pets, keratolysis, cornea, keratopias, tear products, Schirmer's test, Norn's test, general tear production, precornal tear film, fluorescein test.*

Keratolysis (corneal melting) is an urgent inflammatory-infected condition which is accompanied by the involvement of all layers of the cornea in the pathological process. One of the main complications for the eye is the perforation of the cornea due to the melting of its material (type I and IV collagen). Despite of the available research in the field of diagnosis and treatment of animals with keratolysis, there are no scientifically substantiated data in domestic