

Физико-химические показатели также находятся в норме, за исключением содержания жира в образце №1.

Персоналу, занимающемуся реализацией кисломолочной продукции, следует уделить больше внимания чистоте рабочего помещения и санитарно-гигиеническим мерам.

#### **Библиографический список**

1. ГОСТ 31452-2012 «Сметана. Технические условия», дата введения 01.07.2013, стр. 3
2. ТР ТС 033/2013 Технический регламент Таможенного союза "О безопасности молока и молочной продукции"
3. ГОСТ 32901-2014 «Молоко и молочная продукция. Методы микробиологического анализа», дата введения 01.01.2016, стр. 23
4. ГОСТ 31659-2012 «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода Salmonella», дата введения 01.07.2013, стр. 2, 3
5. ГОСТ 30347-2016 «Молоко и молочная продукция. Методы определения Staphylococcus aureus», дата введения 01.09.2017, стр. 5, 6
6. ГОСТ 3624-92 «Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности»
7. ГОСТ 5867-90 «Молоко и молочные продукты. Методы определения жира»
8. ГОСТ 34454-2018 «Продукция молочная. Определение массовой доли белка методом Кьельдаля»

УДК 636.09

#### **ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ИММУНОГО ОТВЕТА ПРИ ЗАРАЖЕНИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПОЧЕЧНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ (VKD)**

*Алонцева Дарья Александровна, м.н.с. лаборатории ихтиопатологии ФГБНУ  
ФНЦ ВИЭВ РАН, livejustonce@yandex.ru*

*Завьялова Елена Александровна, к.б.н., зав. лабораторией ихтиопатологии  
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, aquazeda@yandex.ru*

*Дрошнев Алексей Евгеньевич, к.б.н., в.н.с. лаборатории ихтиопатологии  
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, aquazeda@mail.ru*

***Аннотация:** Бактериальная почечная болезнь (bacterial kidney disease, VKD) является широко распространенной хронической инфекцией, снижающей численность диких популяций лососевых рыб, а также наносящей урон аквакультуре по всему миру. На настоящий момент основными способами контроля распространения VKD является своевременная диагностика и контроль торговли рыбопосадочным материалом, однако какая-либо эффективная вакцина отсутствует. Ключом к пониманию вопроса о разработке вакцины является анализ иммунного ответа рыбы при заражении *Renibacterium salmoninarum*. В статье представлены данные о формировании*

иммунных механизмов при ВКД.

**Ключевые слова:** ВКД, бактериальная почечная болезнь, лососевые рыбы, аквакультура, иммунитет, вакцина

**Введение.** Бактериальная почечная болезнь лососевых рыб (bacterial kidney disease, ВКД) - хроническая вялотекущая инфекция рыб семейства *Salmonidae*. Возбудителем является *Renibacterium salmoninarum* - небольшого размера (0,3–0,1 мкм × 1,0–1,5 мкм), неподвижная, не спорообразующая, не кислотоустойчивая грамположительная диплобацилла, и она является единственным представителем своего рода. Болезнь может протекать субклинически, нанося урон рыбоводческим хозяйствам за счет снижения темпа роста рыбы и постепенной гибели всего поголовья, либо проявляться в хронической форме, вызывая множественные фурункулы на теле рыбы, появление творожистых гранул в почке и других паренхиматозных органах, пучеглазие и потемнение кожных покровов. ВКД является серьезной проблемой для аквакультуры США, стран Скандинавии, Японии и Чили, а в Российской Федерации впервые была обнаружена в 2016 г. сотрудниками лаборатории ихтиопатологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, и с тех пор в рамках ежегодного скрининга ее обнаруживают повсеместно [1]. Основными способами контроля распространения является неспецифическая профилактика: контроль ввоза рыбопосадочного материала, своевременная профилактика и комфортные условия содержания рыбы, поскольку какая-либо эффективная вакцина в настоящее время отсутствует. Сложности разработки эффективной вакцины могут быть связаны с особенностями локализации *Renibacterium salmoninarum* – возбудитель поражает макрофаги рыб, тем самым затрудняя применение классического типа вакцин. Ключом к решению данного вопроса может быть понимание формирования иммунного ответа при заражении ВКД.

**Обсуждение.** Учеными проводилось изучение врожденного иммунного ответа рыб на воздействие возбудителя ВКД, что обеспечило понимание работы иммунных механизмов против факультативного внутриклеточного патогена [2]. Изучение родословных популяций рыб и анализ выживаемости после заражения дало возможность для изучения механизмов врожденного иммунитета.

Исходя из показателей выживаемости после заражения и родословных связей, величина вариаций окружающей среды в сравнении с генетическим влиянием может быть определена как оценка наследуемости ( $h^2$ ). Наследуемость оценивалась по шкале от 0 (отсутствие влияния генетических факторов) к 1 (полноценное генетическое влияние). Проведенные исследования, измеряющие генетическую вариабельность устойчивости лососевых рыб к ВКД, указывают на широкие различия в наследуемости. У кижуча предполагаемый родительский показатель наследуемости при выживании составил  $0,90 \pm 0,26$ . Для трех популяций чавычи в Британской Колумбии показатель наследуемости был низким и умеренным, в то время как

для популяции в реке Колумбия были получены высокие оценки наследуемости по выживаемости ( $0,89 \pm 0,26$ ). Популяция чавычи в озере Мичиган была гораздо более устойчива к заражению ВКД, чем популяция из Грин Ривер. Необходимо отметить, что популяция озера Мичиган в 1988-1992 годах подверглась одной из крупнейших известных энзоотий, и ученые предположили, что различная устойчивость между двумя популяциями является убедительным доказательством того, что управляемый патогенами отбор воздействует на естественную популяцию. В целом высокая наследуемость резистентности, которая варьируется у разных видов и популяций, подчеркивает потенциальное влияние ВКД на генетическую структуру естественной популяции.

Механизмы резистентности рыб к бактериальной почечной болезни до конца не ясны. По данным Судзумото и др., генотип трансферрина коррелирует с устойчивостью к болезням у кижуча. Особи с генотипом АА являются наиболее восприимчивыми, генотипом АС – слабо восприимчивыми, а наличие у рыбы генотипа СС делает ее наиболее устойчивой к заболеваниям. Добавление экзогенного железа не увеличивало смертность от ВКД, и, таким образом, эти данные, взятые вместе, позволяют предположить, что ген трансферрина является косвенным маркером резистентности. В небольшом исследовании Тернера и др., проведенном на 20 нерестящихся атлантических лососях, удалось обнаружить, что гомозиготность по основному локусу гистосовместимости IIВ коррелировала с более высокой нагрузкой бактериальными антигенами и повышенной восприимчивостью.

Другим подходом к выявлению иммунных механизмов является изучение экспрессии генов рыбы и патогена после заражения. Используя метод качественной ПЦР, Грейсон и др. в 2002 г. идентифицировали изменения в экспрессии генов макрофагов и бактериальных генов в очищенных культурах почки, инфицированных *in vitro*. Результаты указывали на быструю активацию воспалительного ответа, включающую повышенную регуляцию интерлейкина-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), главного комплекса гистосовместимости II класса (МНС II), индуцируемую циклооксигеназу (Cox-2), индуцируемую синтазу оксида азота (iNOS), СХС-хемокиновый рецептор 4 (СХС-R4), СС-хемокиновый рецептор 7 (СС-R7) и гены Мх 1-3. Экспрессия фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) первоначально снижалась через 2 ч, а затем, через 24 ч после инфицирования, восстанавливалась. Бактерия заметно экспрессировала ген *msa*, в то время как экспрессия генов гемолизинов *hly* и *rsh* снижалась. Интересно, что во второй серии экспериментов внутримышечная инъекция плазмидной конструкции, экспрессирующей *msa 2*, приводила к иммуносупрессии сигналов IL-1 $\beta$ , Cox-2 и МНС-II, а также к увеличению количества сигналов TNF- $\alpha$ . Однако конструкция ДНК-вакцины на базе гена *msa* не обеспечивала никакой иммунной защиты и усугубляла смертность после заражения. Исследователи предполагают, что *R. salmoninarum* активирует воспалительный ответ, но выживает при первоначальном контакте с макрофагами, избегая и/или вмешиваясь в TNF- $\alpha$ -зависимые пути уничтожения. Избыточная выработка

TNF $\alpha$  приводит к образованию гранулем.

Косвенные данные свидетельствуют о том, что у некоторых зараженных рыб вырабатывается приобретенный иммунитет. Манро и Бруно в 1988 г. описали естественную эпизоотию бактериальной почечной болезни у атлантического лосося, произошедшую во время смолтификации, которая привела к смертности в 18% случаев. У выживших рыб были положительные результаты при микробиологическом исследовании и в ИФА, а также у всех рыб была положительная реакция на агглютинин (РА), наблюдалось рассасывание гранулематозных поражений. Полученные данные говорят об успешном заражении и выздоровлении.

Реакция антител индуцировалась внутрибрюшинным введением убитого *R. salmoninarum*. Однако реакция антител, как правило, медленная и зависит от температуры выращивания рыбы. Рыба вырабатывает устойчивый ответ антител против *p57* [4], а также к пептидогликану, но не к богатому галактозой полисахариду. *R. salmoninarum* устойчив к элиминации сывороткой, и в настоящее время нет доказательств того, что гуморальный иммунитет является достаточно эффективным. На самом деле выработка антител может быть контрпродуктивной. У хронически больных особей форели и чавычи наблюдали утолщение базальных мембран клубочков почки, а также плотные субэндотелиальные отложения. Эти патологические признаки могут представлять собой реакцию гиперчувствительности III типа, которая представляет собой отложение комплекса «антиген-антитело» с последующим опосредованным разрушением тканей организма рыбы, однако нет никаких сообщений о выделении комплексов «антиген-антитело». Попытки вызвать экспериментальную гиперчувствительность III типа путем иммунизации ручьевой форели инактивированным в формалине *R. salmoninarum* (штамм АТСС 33209) не привели к возникновению гломерулопатии, наблюдаемой у хронически больных животных.

Имеются исследования, раскрывающие механизм клеточного иммунитета у рыб, возникающий в ответ на заражение *Renibacterium salmoninarum*. Популяция клеток, индуцированная попаданием патогена в организм хозяина, была обнаружена в селезенке радужной форели и была идентифицирована с помощью *mAb 1C2*. Эти моноклональные антитела распознают  $\beta$ -цепь Т-клеточного рецептора (TCR) и субпопуляцию Ig<sup>+</sup> клеток. После экспериментального заражения патогеном количество клеток 1C2<sup>+</sup> первоначально увеличивается, к 10 неделям их число уменьшается, но они могут быть повторно стимулированы после вторичного заражения. мРНК индуцируемой синтазы оксида азота устойчиво активируется после инъекции *Renibacterium salmoninarum* или погружения в раствор с возбудителем, и вполне вероятно, что выработка активных кислородных интермедиатов (ROI) и активных азотных интермедиатов (RNI) является критическим механизмом уничтожения приобретенного иммунитета.

Профилактика с помощью вакцинации против ВКД затруднена [3]. Прогресс в экспериментах был медленным из-за хронического характера

заболевания и длительного периода, необходимого для испытаний вакцины. Традиционные подходы к разработке вакцин, которые были весьма успешными против грамотрицательных бактерий, в целом вызывали разочарование при применении к *R. salmoninarum*. Иммуитет, обеспечивающий эффективность вакцинации внеклеточными продуктами или инактивированными формалином бактериальными клетками достаточно слабый. Было опробовано несколько новых подходов к вакцинации. Один из них включал в себя удаление ассоциированного с бактерией белка р57, участвующего в формировании иммунитета и патологической реактивности при помощи термообработки жизнеспособного *R. salmoninarum* при 37°C. Инкубация стимулировала активность эндогенной протеазы, тем самым удаляя р57 с поверхности клетки. Вакцинация кижуча цельными клетками инъекционным и пероральным путем приводила к отсроченной смертности и снижению инфицирования. Другой подход к вакцинации заключался в применении спонтанных мутантов *R. salmoninarum*, которым больше не требовалась добавка цистеина для роста. Внутривентральное введение аттенуированных штаммов-мутантов создало значительный иммунитет. Природа спонтанной мутации(ий) и возможного возврата к вирулентной форме неясна. Гриффитс и др. (1998) сообщили, что вакцинация *Arthrobacter*, близкородственным микроорганизмом, способна стимулировать перекрестный защитный иммунитет. Штамм был выделен из почек чавычи и классифицирован как *Arthrobacter spp.* на основании последовательности рРНК и аналитического профилирующего индекса (API). Штамм культивировали на чашках с триптозно-соевым агаром (TSA). Этот штамм продуцировал углевод, который вступал в перекрестную реакцию с *R. salmoninarum*, что, возможно, объясняет его эффективность. Штамм *Arthrobacter spp.* является одобренной коммерческой вакциной под названием «Renogen» (USA Patent No. 6,627,203, 2003). Крупномасштабное полевое исследование с атлантическим лососем продемонстрировало снижение смертности от ВКД и увеличение роста. Однако в экспериментальных исследованиях на чавыче «Реноген» обеспечивал у рыб, подвергшихся внутривентральной инъекции, невысокий титр антител, и показал отсутствие иммунитета у рыб, подвергшихся совместному проживанию.

На протяжении последних лет сотрудниками лаборатории ихтиопатологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН предпринимались попытки по иммунизации рыб моновалентным подготовленным антигеном *R. salmoninarum*, а также поливалентными антигенами, состоящими из различных бактериальных комбинаций, включающих *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas salmonicida sp. salmonicida*, *Listonella anguillarum* и *Renibacterium salmoninarum*. Полученные данные свидетельствуют о том, что добавление в комбинации антигена *R. salmoninarum*, усиливало защитный эффект от других заболеваний в большей степени, чем от гомологичной инфекции [5].

Специальные органеллы клетки – микровезикулы (MV) способны транспортировать различные компоненты бактериальной клетки во внешнюю среду, другим клеткам патогена или клеткам организма-хозяина, тем самым

играя роль в формировании иммунного ответа. По данным немецких ученых, фракции микровезикул, полученные от *R. salmoninarum*, содержали белок p57, ответственный за вирулентность патогена, p22, вызывающий иммуносупрессию организма рыбы, а также белки адгезии [6].

**Заключение.** Для рыб семейства лососевые характерно как проявление приобретенного иммунитета против ВКД, так и врожденного, полученного при переболевании маточного поголовья, однако его напряженность не достигает достаточных значений. Имеются данные о существовании генетически резистентного поголовья, которое возможно получить путем тщательной селекции. На формирование приобретенного иммунитета влияют такие факторы, как интерлейкин-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), главный комплекс гистосовместимости II класса (МНС II), индуцируемая циклооксигеназа (Cox-2), индуцируемая синтаза оксида азота (iNOS), СХС-хемокиновый рецептор 4 (СХС-R4), СС-хемокиновый рецептор 7 (СС-R7) и гены Mx 1-3, при этом *R. salmoninarum* активирует воспалительный ответ, но выживает при первоначальном контакте с макрофагами, избегая и/или вмешиваясь в TNF- $\alpha$ -зависимые пути уничтожения. Избыточная выработка TNF $\alpha$  приводит к образованию гранулем. Применение классического типа вакцин затруднено, однако добавление в комбинации поливалентных бактериальных антигена *R. salmoninarum*, усиливает защитный эффект от других заболеваний в большей степени, чем от гомологичной инфекции. Специальные органеллы клеток – микровезикулы – могут выступить в качестве курьеров для транспортировки белка p57, ответственного за вирулентность патогена, p22, вызывающего иммуносупрессию организма рыбы, а также белки адгезии, и таким образом, на основе фракций данных органелл возможно создание специфически направленного типа вакцин, способного доставить необходимые компоненты в макрофаги рыбы.

### Библиографический список

1. Droshnev A.E., Bulina K.Y., Alontseva D.A., Belimenko V.V., Zavyalova E.A. Microbiological monitoring of causative agents of infectious diseases of salmon in the Northwest region / A.E. Droshnev, K.Y. Bulina, D.A. Alontseva, V.V. Belimenko, E.A. Zavyalova // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2019. – Vol. 315. – P. 72007.
2. Gnanagobal H., Santander J. Host-Pathogen Interactions of Marine Gram-Positive Bacteria / H. Gnanagobal, J. Santander // Biology (Basel). – 2022. – Vol. 11 (9). – P. 1316.
3. Fish Vaccination / D. G. Elliott [et al.]. – USA: Western Fisheries Research Center, 2014. – 448 p.
4. Aguilar M., Isla A., Barrientos C.A., Flores-Martin S.N., Blanco J.A., Enríquez R., Figueroa J., Yañez A.J. Genomic and proteomic aspects of p57 protein from *Renibacterium salmoninarum*: Characteristics in virulence patterns / M. Aguilar, A. Isla, C.A. Barrientos, S.N. Flores-Martin, J.A. Blanco, R. Enríquez, J. Figueroa, A.J. Yañez // Microb Pathog. – 2023. – Vol. 174. – P. 105932.

5. Droshnev A.E., Zavyalova E.A., Karpova M.A., Alontseva D.A. Features of the immune response of rainbow trout to vaccination of antigens *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas salmonicida*, *Listonella anguillarum* and *Renibacterium salmoninarum* / A.E. Droshnev, E.A. Zavyalova, M.A. Karpova, D.A. Alontseva // E3S Web of Conferences. – 2023. – Vol. 390. – P. 07031.

6. Kroniger T., Flender D., Schlüter R., Köllner B., Trautwein-Schult A., Becher D. Proteome analysis of the Gram-positive fish pathogen *Renibacterium salmoninarum* reveals putative role of membrane vesicles in virulence / T. Kroniger, D. Flender, R. Schlüter, B. Köllner, A. Trautwein-Schult, D. Becher // Sci Rep. – 2022. – Vol. 12. – P. 3003.

УДК 619:004

## ПОТЕНЦИАЛ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ В ГЕМАТОЛОГИИ КРОЛИКОВ

*Павлова М.А., аспирант кафедры ветеринарной медицины ФГБОУ ВО «РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева», РФ, pavl.frost@gmail.com*

*Акчури С.В., профессор кафедры ветеринарной медицины ФГБОУ ВО «РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева», РФ, sakchurin@rgau-msha.ru*

**Аннотация:** В статье рассматривается возможность применения машинного обучения в гематологии кроликов и оценивается потенциальная польза от применения данной технологии.

**Ключевые слова:** искусственный интеллект, машинное обучение, мониторинг, кролики, гематология

Микроскопия окрашенного мазка крови является «золотым стандартом» диагностики болезней крови, а, следовательно, развитие технологии, позволяющие усовершенствовать рутинное выполнение таких исследований являются приоритетным направлением в медицине и ветеринарии. Например, технологии искусственного интеллекта на сегодняшний день показывают впечатляющие результаты в гуманной медицине. Существует несколько общих направлений применения машинного обучения в гематологии человека: оценка и классификация лейкоцитов и эритроцитов, обнаружение кровепаразитов, подсчет тромбоцитов и ретикулоцитов и др. [6].

Оценка лейкоцитов с использованием искусственного интеллекта включает в себя два направления. Первое направление – дифференциация клеток на виды – нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, лимфоциты, моноциты. На данный момент чувствительность программы, решающей эту задачу в человеческой гематологии, оценивается как 85-99%, а специфичность больше 96%. Точность таких систем приближается к точности ручной микроскопии, однако пока все эти системы используются исключительно как помощь в работе морфолога, а не полная его замена [6].