

## ВЛИЯНИЕ ЭКОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ НА КОНЦЕНТРАЦИЮ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ В СЕЛЕЗЁНКЕ ГЕРЕФОРДСКОГО СКОТА, РАЗВОДИМОГО В УСЛОВИЯХ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ И АЛТАЙСКОГО КРАЯ

К. Н. Нарожных, кандидат биологических наук,  
заведующий лабораторией

Новосибирский государственный аграрный  
университет, Новосибирск, Россия  
E-mail: nkn.88@mail.ru

**Ключевые слова:** герефордская порода, селезёнка, тяжёлые металлы, кадмий, свинец, цинк, медь, экология

**Реферат.** Загрязнение пищевой цепи тяжёлыми металлами стало актуальной проблемой в последние годы из-за их потенциального накопления в биосистемах вследствие возросшего антропогенного воздействия. В этом исследовании оценивали уровни кадмия, свинца, меди и цинка у крупного рогатого скота из Краснозерского, Маслянинского, Новосибирского районов Новосибирской области и Целинного района Алтайского края. Цель исследования – оценить влияние эколого-географического фактора на содержание тяжёлых металлов в селезёнке бычков герефордской породы. Пробы селезёнки были взяты от 31 клинически здорового бычка герефордской породы в возрасте 16–18 месяцев. Пробоподготовка осуществлялась в соответствии с ГОСТ 26929–94 и 30178–96. Определение химического состава проб проводили методом атомно-абсорбционной спектроскопии с пламенной и электротермической атомизацией. Медианные значения по содержанию меди, цинка, свинца и кадмия в селезёнке бычков, разводимых в Краснозерском, Маслянинском Новосибирском и Целинном районах, находились в диапазоне 1,6–1,8; 21,0–22,4; 0,06–1,45; 0,01–0,09 мг/кг. Фенотипическая изменчивость уровня меди и цинка была относительно низкой, а свинца и кадмия – высокой. Влияние эколого-географического фактора было характерно только для уровня кадмия. Выявлены значимые отличия по концентрации кадмия в селезёнке у животных, выращенных в Маслянинском районе, от разводимых в Краснозерском и Новосибирском районах. Для меди, цинка и свинца были рассчитаны референсные интервалы – 0,60–2,92; 17,2–26,0; 0,019–0,218 мг/кг соответственно. Они могут служить ориентировочной нормой для скота герефордской породы, разводимого на территориях Краснозерского, Новосибирского, Маслянинского районов Новосибирской области и Целинного района Алтайского края.

## THE INFLUENCE OF ECOLOGICAL AND GEOGRAPHICAL CONDITIONS ON THE CONCENTRATION OF HEAVY METALS IN THE SPLEEN OF HEREFORD CATTLE BRED IN THE CONDITIONS OF THE NOVOSIBIRSK AND ALTAI REGIONS

K.N. Narozhnikh, Candidate of Biological Sc., Head of the Laboratory  
Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk. Russia

**Key words:** Hereford breed, spleen, heavy metals, cadmium, lead, zinc, copper, ecology.

**Abstract.** Contamination of the food chain with heavy metals has become an urgent problem in recent years due to their potential accumulation in biosystems and is related to increased anthropogenic impact. This study assessed the levels of cadmium, lead, copper and zinc in cattle from the Novosibirsk, Krasnozersk, and Maslyanino regions of the Novosibirsk region and the Tselinny region of the Altai region. The aim of

*the study is to assess the influence of the ecological and geographical factors on the content of heavy metals in the spleen of Hereford gobies. Spleen samples were taken from 31 clinically healthy Hereford bulls aged 16-18 months. Sample preparation was carried out in accordance with GOST 26929-94 and 30178-96. The determination of the chemical composition of the samples was carried out by atomic absorption spectrometry with flame and electrothermal atomization. The median values for the content of copper, zinc, lead and cadmium in the spleen of bull calves bred in Krasnozersky, Maslyaninsky, Novosibirsk and Tselinny regions were in the range of 1.6-1.8; 21.0-22.4; 0.06-1.45; 0.01-0.09 mg / kg. The phenotypic variability of the level of copper and zinc was relatively low, while that of lead and cadmium was high. The influence of the ecological and geographical factor was characteristic only for the level of cadmium. Significant differences in the concentration of cadmium in the spleen in animals raised in the Maslyanino region from those bred in the Krasnozersk and Novosibirsk regions were revealed. For copper, zinc and lead reference intervals were calculated - 0.60-2.92; 17.2-26.0; 0.019-0.218 mg / kg, respectively. They can serve as a rough guideline for Hereford cattle bred in the Krasnozersk, Novosibirsk, Maslyanino districts of the Novosibirsk region and the Tselinny district of the Altai region.*

С экологической точки зрения все металлы, которые могут быть токсичными, часто классифицируются как тяжёлые металлы [1]. Они накапливаются в почве, растениях и животных. Загрязнение пищевой цепи тяжёлыми металлами стало актуальной проблемой в последние годы из-за их потенциального накопления в биосистемах вследствие возросшего антропогенного воздействия [2–4].

Тяжёлые металлы в определённых концентрациях всегда присутствуют в организме крупного рогатого скота, и в селезёнке в том числе. При дисбалансе химических элементов может происходить нарушение функций органов и систем [5]. Селезёнка является ретикулоэндотелиальным, лимфатическим и кроветворным органом, оперативно реагирующим на воздействие неблагоприятных факторов. Она состоит из красной пульпы, отвечающей за депонирование зрелых форменных элементов крови, а также за контроль состояния и разрушения старых и повреждённых эритроцитов и тромбоцитов и белой пульпы, которая активирует иммунный ответ, когда в крови присутствуют антигены и антигена [6].

Сельскохозяйственные животные, особенно жвачные, являются очень важными биоиндикаторами загрязнения окружающей среды [7]. Следовательно, необходимо отслеживать и оценивать воздействие тяжёлых металлов в различных районах и биогеохимических провинциях, чтобы иметь представление

об их влиянии на уровень тяжёлых металлов в организме животных и их физиологические нормы [8].

Цель исследования – оценить влияние эколого-географического фактора на содержание тяжёлых металлов и их референсные интервалы в селезёнке бычков герефордской породы.

#### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследования была селезёнка, взятая от 31 бычка герефордской породы в возрасте 16–18 месяцев. Животные выращивались на территории Краснозерского (n=4), Новосибирского (n=6) и Маслянинского (n=17) районов Новосибирской области и в Целинном районе (n=4) Алтайского края. Пробы у животных отбирали непосредственно после убоя с последующей заморозкой и хранением при температуре –24°C. Животные на момент убоя были клинически здоровы.

Определение химического состава селезёнки осуществлялось методом атомно-абсорбционной спектроскопии с пламенной и электротермической атомизацией на спектрометре Shimadzu AA-7000. Пробоподготовка осуществлялась в соответствии с ГОСТ 26929–94 и 30178–96.

Для характеристики содержания тяжёлых металлов в селезёнке рассчитывали робастные показатели описательной статистики:

медиану, первую и третью квартили, межквартильный размах, минимум и максимум. Гомоскедастичность дисперсий оценивали с помощью критерия Флигнера-Килина. С целью выявления различий между районами по концентрации тяжелых металлов применяли тест Краскела-Уоллиса [9]. Апостериорный анализ выполняли с применением теста Данна [10] с поправкой Холма [11]. Референтные интервалы определяли робастным методом (robust method), доверительные интервалы для референсных пределов рассчитывали с использованием бутстрэппинга методом скорректированных и несмещённых процентильных интервалов (bias-corrected and accelerated) [12], который корректирует возможное смещение и асимметрию в исходном распределении. Статистическую обработку исходных данных проводили с использованием языка статистического программирования R и среды анализа данных RStudio, версии 1.2.5033.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные по содержанию тяжёлых металлов в селезёнке бычков представлены в табл. 1. Межгрупповая фенотипическая изменчивость концентрации меди и цинка была относительно низкой, максимальное значение межквартильного размаха (IQR) зафиксировано в Маслянинском районе. Уровень свинца и кадмия имеет более высокую вариабельность, особенно заметную в Краснозерском районе.

Концентрация эссенциальных элементов меди и цинка в изученных районах была достаточно равномерной (рисунок). Напротив, уровень поллютантов кадмия и свинца обладал достаточно высокой внутригрупповой изменчивостью. Так, уровень свинца в Краснозерском районе был более чем в 2 раза ниже относительно других районов, а содержание кадмия у скота из Маслянинского райо-

Таблица 1

Содержание ТМ в селезёнке быков герефордской породы, мг/кг  
HM content in the spleen of Hereford bulls, mg / kg

Район	Me	Min	Max	Q1	Q3	IQR
<i>Медь</i>						
Краснозерский	1,80	1,60	2,40	1,64	2,19	0,55
Маслянинский	1,68	0,75	3,24	1,44	2,18	0,74
Новосибирский	1,80	1,60	2,70	1,60	2,06	0,46
Целинный	1,60	1,40	2,00	1,44	1,88	0,43
<i>Цинк</i>						
Краснозерский	21,00	18,60	21,60	19,50	21,40	1,92
Маслянинский	22,40	16,30	27,10	20,40	22,90	2,52
Новосибирский	22,10	20,40	25,00	20,90	23,30	2,40
Целинный	21,10	19,70	21,60	20,10	21,60	1,44
<i>Свинец</i>						
Краснозерский	0,060	0,030	0,110	0,034	0,098	0,063
Маслянинский	0,125	0,065	0,238	0,106	0,158	0,052
Новосибирский	0,120	0,070	0,150	0,088	0,141	0,053
Целинный	0,145	0,060	0,210	0,077	0,202	0,125
<i>Кадмий</i>						
Краснозерский	0,090	0,030	0,150	0,040	0,140	0,100
Маслянинский	0,010	0,002	0,022	0,007	0,014	0,007
Новосибирский	0,080	0,080	0,120	0,080	0,113	0,033

на было ниже в 8–9 раз, чем в Новосибирском и Краснозерском.

В научных работах уделяется мало внимания оценке уровня тяжёлых металлов в селезёнке крупного рогатого скота. Возможно, это связано с тем, что селезёнка не является основным продуктом мясной промышленности. Тем не менее существуют исследования, где изучалось накопление в ней металлов. Так, в статье М. Miranda и др. [13] было установлено, что у бычков в 10-месячном возрасте, получавших добавку 35 мг/кг  $\text{CuSO}_4$ , кон-

центрация меди в селезёнке была в среднем в 2–2,2 раза ниже, чем в нашем исследовании. В другом эксперименте изучались животные голштино-фризской, галисийской белой пород и их помесей, разводимых на севере Испании. В работе говорится об отсутствии межпородных различий в концентрации меди и цинка в селезёнке скота. Уровень цинка был сопоставим с полученным в нашем исследовании, однако концентрация меди была в 2 раза ниже у скота из Испании [14].

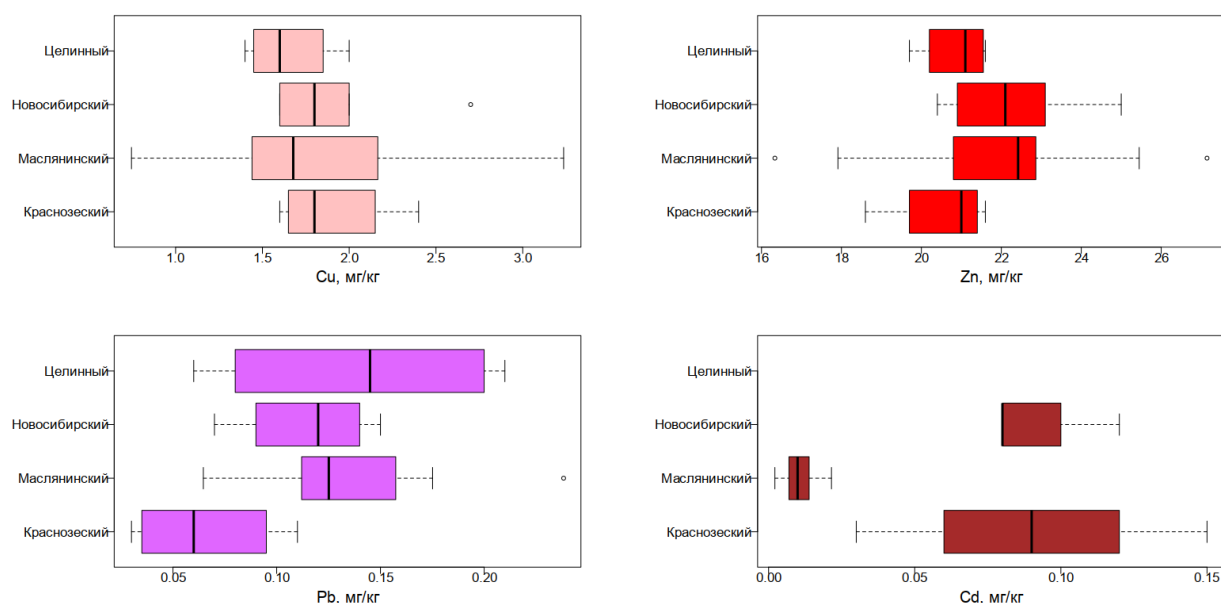


Диаграмма размаха концентрации тяжёлых металлов в селезёнке герефордского скота  
Range diagram of the concentration of heavy metals in the spleen of Hereford cattle

Для проведения дисперсионного анализа осуществлялась проверка условия однородности дисперсий. В результате применения теста Флигнера-Килина оснований для отклонения нулевой гипотезы о гомоскедастичности дисперсий не выявлено (табл. 2).

Несмотря на выполнение этого условия, было принято решение использовать тест Краскела-Уоллиса для выявления влияния эколого-географического фактора, так как невозможно достоверно оценить характер распределения признаков в силу малочисленности некоторых групп. В результате только в случае с содержанием кадмия в селезёнке

Таблица 2  
Оценка гомоскедастичности дисперсий тяжёлых металлов в селезёнке скота методом Флигнера-Килина  
Evaluation of the homoscedasticity of dispersions of heavy metals in the spleen of livestock by the Fligner-Kilin method

Показатель	$\chi^2$	df	p
Кадмий	3,2455	2	0,1974
Свинец	6,1259	3	0,1056
Медь	5,13	3	0,1625
Цинк	3,0593	3	0,3826

бычков было выявлено значимое влияние фактора, во всех остальных случаях различия были вызваны случайными факторами (табл. 3).



Таблица 3

**Влияние фактора районирования на уровень тяжелых металлов в селезёнке животных герефордской породы**

**The influence of the zoning factor on the level of heavy metals in the spleen of animals of the Hereford**

Переменные	N	df	p
Кадмий–район	12,760	2	0,0017
Свинец–район	6,852	3	0,0768
Медь–район	1,118	3	0,7727
Цинк–район	3,703	3	0,2954

После непараметрического дисперсионного анализа был проведён апостериорный анализ. Парные сравнения показали значительное отличие животных из Маслянинского района от выращенных в Краснозерском и Новосибирском районах (табл. 4). Возможно, данные различия обусловлены значительной изменчивостью кадмия, которая характерна для однородных популяций крупного рогатого скота [8], и ограниченными выборками из районов. Чтобы подтвердить данное предположение, необходимо продолжать мониторинг уровня кадмия у животных.

Таблица 4

**Межгрупповое сравнение районов по содержанию кадмия в селезёнке герефордского скота (Z-критерий)**

**Intergroup comparison of areas for cadmium content in the spleen of Hereford cattle (Z-test)**

Район	Краснозерский	Маслянинский
Маслянинский	2,747547*	
Новосибирский	0,060207	-2,669046*

\* $P < 0,05$ .

В результате эксперимента не было выявлено влияния эколого-географического фактора на содержание меди, цинка и свинца. Следовательно, можно объединить животных в одну группу по каждому из химических элементов с целью расчёта референсных интервалов, который осуществлялся на основе руководства по обеспечению качества и лабораторных стандартов Американского общества ветеринарной клинической патологии [15] с учётом протоколов экспертов Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI)

[16]. Данные по референсным интервалам концентрации тяжёлых металлов в селезёнке герефордского скота представлены в табл. 5.

Таблица 5

**Референсные интервалы с 90 %-ми доверительными интервалами (ДИ) для содержания тяжёлых металлов в селезёнке герефордского скота, мг/кг**  
**Reference intervals with 90% confidence intervals (CI) for the content of heavy metals in the spleen of Hereford cattle, mg / kg**

Показатель	Референсный интервал	Нижний предел 90 %-го ДИ	Верный предел 90 %-го ДИ
Медь	0,60–2,92	0,203–0,847	2,65–3,35
Цинк	17,2–26,0	15,6–18,2	25,0–27,7
Свинец	0,019–0,218	0–0,040	0,196–0,253

Представленные нами референсные значения отличаются от предложенных R. Puls [17]. Так, в нашем исследовании уровень свинца был меньше в 4,5 раза по нижнему интервалу, а концентрация меди выше в 3 раза. По данным В.И. Георгиевского и др. [18], средние показатели содержания цинка в селезёнке млекопитающих – 10–20 мг/кг, что сопоставимо с предложенными нами значениями. В представленные референсные интервалы входят значения по содержанию цинка и меди в селезёнке, выявленные у крупного рогатого скота различных направлений продуктивности, разводимого Европе [13, 14].

## ВЫВОДЫ

1. Установлено значительное влияние эколого-географического фактора на содержание кадмия в селезёнке бычков герефордской породы. Различий между изученными районами по содержанию цинка, меди и свинца в селезёнке животных не выявлено.
2. В Краснозерском и Новосибирском районах уровень кадмия в 8–9 раз выше, чем в Маслянинском районе.
3. Фенотипическая изменчивость микроэлементов кадмия и свинца значительно выше, чем меди и цинка.
4. Полученные значения содержания тяжёлых металлов в селезёнке могут служить условной нормой для герефордского скота,

разводимого на территориях Краснозерского, Новосибирской области и Целинного района Новосибирского, Маслянинского районов Алтайского края.

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Status of toxic heavy metals in cattle of Haryana* / K. Naveen, K. Sandeep, G. Renu [et al.] // *Haryana Veterinarian*. – 2019. – Vol. 58, N 1. – P. 114–116.
2. *Influence of anthropogenic pollution on interior parameters, accumulation of heavy metals in organs and tissues, and the resistance to disorders in the yak population in the Republic of Tyva* / O.I. Sebezhko, V.L. Petukhov, N.I. Shishin [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. – 2017. – Vol. 9, N 9. – P. 1530–1535.
3. *Biochemical, hematological and mineral parameters in pigs of two breeds reared in large industrial complexes of Western Siberia* / O.I. Sebezhko, O.S. Korotkevich T. V. Konovalova [et al.] // 3rd International Symposium for Agriculture and Food: Proceeding of Abstract, 18–20 October 2017. – Ohrid, Macedonia, 2017. – P. 100.
4. *Comparative assessment of radioactive strontium and cesium contents in the feedstuffs and dairy products of Western Siberia* / O.I. Sebezhko, V.L. Petukhov, O.S. Korotkevich [et al.] // *Indian Journal of Ecology*. – 2017. – Vol. 44, N 3. – P. 662–666.
5. *Heavy metals in pig muscles* / O.A. Zaiko, V.L. Petukhov, T. V. Konovalova [et al.] // 17th International Conference of Heavy Metals in the Environment: Proceeding of Abstract, 22–26 September 2014. – Guiyang, China, 2014. – P. 76.
6. *Biometrical Study on Normal Spleen of Cattle* / H. Khan, M. Pardegi, R. Rind [et al.] // *Journal of Animal and Veterinary Advances*. – 2003. – Vol. 2, N 2. – P. 92–94.
7. *The reference intervals of hair trace element content in hereford cows and heifers (Bos taurus)* / S.A. Mi-roshnikov, O.A. Zavyalov, A.N. Frolov [et al.] // *Biological trace element research*. – 2017. – Vol. 180, N 1. – P. 56–62.
8. *Cadmium level in soil, coarse fodder, organs and tissue of cattle West Siberia* / V.L. Petukhov, A.I. Syso, K. N. Narozhnykh [et al.] // 18th International Conference on Heavy Metals in the Environment: Proceeding of Abstract, 12–15 September 2016. – Ghent, Belgium, 2016. – S10-P07.
9. *Kruskal W.H., Wallis A.* Use of ranks in one-criterion variance analysis // *Journal of the American Statistical Association*. – 1952. – Vol. 47. – P. 583–621.
10. *Dunn O.J.* Multiple comparisons using rank sums // *Technometrics*. – 1964. – Vol. 6. – P. 241–252.
11. *Holm S.* A simple sequentially rejective multiple test procedure // *Scandinavian Journal of Statistics*. – 1979. – Vol. 6. – P. 65–70.
12. *Efron B., Tibshirani R.J.* An introduction to the bootstrap. – Boca Raton: CRC press, 1994. – 456 p.
13. *How copper supplementation affect its distribution in organs of the beef cattle?* / M. Miranda, J.L. Benedito, B. Gutiérrez [et al.] // Conference: International Symposium on Trace Elements in The Food Chain: Proceeding of Abstract, 21–23 May 2009. – Budapest, Hungary, 2009. – P. 132–136.
14. *Trace element concentrations in beef cattle related to the breed aptitude* / V. Pereira, P. Carbajales, M. López-Alonso [et al.] // *Biological trace element research*. – 2018. – Vol. 186, N 1. – P. 135–142.
15. *ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics* / K.R. Friedrichs, K.E. Harr, K.P. Freeman [et al.] // *Veterinary clinical pathology*. – 2012. – Vol. 41, N 4. – P. 441–453.
16. *Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory* – 3th ed.; CLSI Document C28-A3c. Approved guideline – Wayne, Pa., USA: CLSI, 2010. – 59 p.
17. *Puls R.* Mineral Levels in Animal Health. Diagnostic data. – Columbia: Sherpa International, 1988. – 168 p.
18. *Георгиевский В.И., Анненков Б.Н., Самохин В.Т.* Минеральное питание животных. – М.: Колос, 1979. – 471 с.

## REFERENCES

1. Naveen K., Sandeep K., Renu G., Anita G., Status of toxic heavy metals in cattle of Haryana, *Haryana Veterinarian*, 2019, Vol. 58, No. 1, pp. 114–116.
2. Sebezhko O.I., Petukhov V.L., Shishin N.I., Korotkevich O.S., Konovalova T.V., Narozhnykh K.N., Zheltikov A.I., Marenkov V.G., Nezavitin A.G., Osadchuk L.V., Chysyma R.B., Kuzmina E.E., Influence of anthropogenic pollution on interior parameters, accumulation of heavy metals in organs and tissues, and the resistance to disorders in the yak population in the Republic of Tyva, *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2017, Vol. 9, No. 9, pp. 1530–1535.
3. Sebezhko O.I., Korotkevich O.S., Konovalova T.V., Biryulya I.K., Petukhov V.L., Kamaldinov E.V., Narozhnykh K.N., Osadchuk L.V., Biochemical, hematological and mineral parameters in pigs of two breeds reared in large industrial complexes of Western Siberia, *3rd International Symposium for Agriculture and Food: Proceeding of Abstract*, 18–20 October 2017. – Ohrid, Macedonia, 2017, pp. 100.
4. Sebezhko O.I., Petukhov V.L., Korotkevich O.S., Konovalova T.V., Kamaldinov E.V., Syso A.I., Marmuleva N.I., Narozhnykh K.N., Barinov E.Y., Osadchuk L.V., Sokolov V.A., Comparative assessment of radioactive strontium and cesium contents in the feedstuffs and dairy products of Western Siberia, *Indian Journal of Ecology*, 2017, Vol. 44, No. 3, pp. 662–666.
5. Zaiko O.A., Petukhov V.L., Konovalova T.V., Korotkevich O.S., Narozhnykh K.N., Kamaldinov E.V., Sebezhko O.I., Heavy metals in pig muscles, *17th International Conference of Heavy Metals in the Environment: Proceeding of Abstract*, 22–26 September 2014, Guiyang, China, 2014, pp. 76.
6. Khan H., Pardehi M., Rind R., Rind M.M., Biometrical Study on Normal Spleen of Cattle, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2003, Vol. 2, No. 2, pp. 92–94.
7. Miroshnikov S.A., Zavyalov O.A., Frolov A.N., Bolodurina I.P., Kalashnikov V.V., Grabeklis A.R., Tikhonov A.A., Skalny A.V., The reference intervals of hair trace element content in hereford cows and heifers (*Bos taurus*), *Biological trace element research*, 2017, Vol. 180, No. 1, pp. 56–62.
8. Petukhov V.L., Syso A.I., Narozhnykh K.N., Konovalova T.V., Korotkevich O.S., Sebezhko O.I., Kamaldinov E.V., Osadchuk L.V., Soloshenko V.A., Myadelets M.A., Titova T.V., Tsygankova A.R., Saprykin A.I., Cadmium level in soil, coarse fodder, organs and tissue of cattle West Siberia, *18th International Conference on Heavy Metals in the Environment: Proceeding of Abstract*, 12–15 September 2016, Ghent, Belgium, 2016, S10-P07.
9. Kruskal W.H., Wallis A., Use of ranks in one-criterion variance analysis, *Journal of the American Statistical Association*, 1952, Vol. 47, pp. 583–621.
10. Dunn O.J., Multiple comparisons using rank sums, *Technometrics*, 1964, Vol. 6, pp. 241–252.
11. Holm S., A simple sequentially rejective multiple test procedure, *Scandinavian Journal of Statistics*, 1979, Vol. 6, P. 65–70.
12. Efron B., Tibshirani R.J., *An introduction to the bootstrap*, Boca Raton: CRC press, 1994, 456 p..
13. Miranda M., Benedito J.L., Gutiérrez B., Blanco-Penedof., García-Vaquero M., López-Alonso M., How copper supplementation affect its distribution in organs of the beef cattle?, *Conference: International Symposium on Trace Elements in The Food Chain: Proceeding of Abstract*, 21–23 May 2009. – Budapest, Hungary, 2009, pp. 132–136.
14. Pereira V., Carbajales P., López-Alonso M., Miranda M., Trace element concentrations in beef cattle related to the breed aptitude, *Biological trace element research*, 2018, Vol. 186, No. 1, pp. 135–142.
15. Friedrichs K.R., Harr K.E., Freeman K.P., Szladovits B., Walton R.M., Barnhart, K.F., Blanco-Chavez J., ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics, *Veterinary clinical pathology*, 2012, Vol. 41, No. 4, pp. 441–453.
16. *Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory*, 3th ed.; CLSI Document C28-A3c. Approved guideline, Wayne, Pa., USA: CLSI, 2010, 59 p.
17. Puls R., *Mineral Levels in Animal Health. Diagnostic data*, Columbia: Sherpa International, 1988, 168 p.
18. Georgievskii V.I., Annenkov B.N., Samokhin V.T., *Mineral'noe pitanie zhivotnykh*, Moscow: Kolos, 1979, 471 p.