

*Журнал включен в список Высшей Аттестационной Комиссии (ВАК) Беларуси по отраслям: ветеринарные науки, биологические науки, сельскохозяйственные науки, приказ коллегии ВАК, протокол № 17/7 от 19.06.2008 г.*

**Учредители:** РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности РАСХН»

**ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР :**

**Красочко П.А.** – доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор

**ЗАМ. ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА:**

**Якубовский М.В.** – доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент ААН РБ

**СЕКРЕТАРЬ:**

**Щемелёва Н.Ю.** – кандидат ветеринарных наук

**РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:**

**Кучинский М.П.** – доктор ветеринарных наук, доцент

**Насонов И.В.** – доктор ветеринарных наук, доцент

**Ястребов А.С.** – доктор ветеринарных наук, доцент

**Журавлёва Е.С.** – кандидат ветеринарных наук

**Новикова О.Н.** – кандидат ветеринарных наук

**НАД НОМЕРОМ РАБОТАЛИ:**

**Володкович М.М. Ларькова А.Е.**

Ответственность за достоверность данных несут авторы статей. Опубликованные материалы отражают точку зрения авторов и не всегда совпадают с точкой зрения редколлегии.

При использовании авторами материалов журнала «Экология и животный мир» ссылка на журнал **обязательна**

**РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:**

**ПРЕДСЕДАТЕЛЬ**

**Красочко И.А.** – доктор ветеринарных наук, профессор (г. Минск)

**Члены редакционного совета:**

**Албулов А.И.** – доктор биологических наук, профессор (г.Щёлково РФ)

**Белова Л.М.** – доктор биологических наук, профессор (г.Санкт-Петербург)

**Головко А.Н.** – доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент НААН Украины (г.Киев)

**Голушко В.М.** – доктор сельскохозяйственных наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси (г.Жодино)

**Денисов А.А.** – доктор биологических наук, профессор (г.Щёлково РФ)

**Лысенко Н.П.** – доктор биологических наук, профессор (г.Москва)

**Пестис В.К.** – доктор сельскохозяйственных наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси (г.Гродно)

**Стекольников А.А.** – доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН (г.Санкт-Петербург)

**Субботин А.М.** – доктор биологических наук, профессор (г.Минск)

**Титов Л.П.** – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси (г.Минск)

**Чистенко Г.Н.** – доктор медицинских наук, профессор (г.Минск)

**Шейко И.П.** – доктор сельскохозяйственных наук, профессор, академик НАН Беларуси (г.Жодино)

**Ярыгина Е.И.** – доктор биологических наук, профессор (г.Москва)

**Ятусевич А.И.** – доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАСХН (г. Витебск)

**Все статьи рецензируются**

© «Экология и животный мир»

СО Д Е Р Ж А Н И Е	C O N T E N T S
<b>Кривенок Л.Л., Каменская Т.Н., Лукьянчик С.А.</b> ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СРЕДСТВА ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕГО “КРИОКС” 3	<b>Krivenok L.L., Kamenskaya T.N., Lukyanchik S.A.</b> THE TOXICOLOGICAL PROPERTIES OF DISINFECTANTS "CRYOX " 3
<b>Кучинский М.П.</b> БИОЭЛЕМЕНТНЫЙ СТАТУС ОРГАНИЗМА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ ХОЗЯЙСТВ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ, СПОСОБЫ И СРЕДСТВА ЕГО КОРРЕКЦИИ 9	<b>Kuchinski M.P.</b> THE BIOELEMENTAL STATUS OF THE FARM ANIMALS IN BELARUS FARMS, THE MEANS AND THE METHODS OF ITS CORRECTION 9
<b>Джупина С.И.</b> ОСОБЕННОСТИ ПРОФИЛАКТИКИ НЕКРОБАКТЕРИОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА (ОБЗОР) 17	<b>Dzhupina S.I.</b> FEATURES PREVENT NECROBACTERIOSIS CATTLE (REVIWE) 17
<b>Тяпша Ю.И., Дубаневич О.В.</b> ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ПОСТАНОВКИ ПЦР ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ГЕНОМА <i>MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE</i> 23	<b>Tsiapsha Y.I., Dubanevich O.V.</b> PARAMETER OPTIMIZATION of PCR FOR DETECTION OF <i>MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE</i> GENOME 23
<b>Полторжицкая Р.С.</b> ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОПАРАЗИТОЦЕНОЗОВ В КИШЕЧНИКЕ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ <i>APIS MELIFERA</i> L. ПРИ НОЗЕМАТОЗНОМ ПРОЦЕССЕ 31	<b>Poltorzyskaya R.S.</b> FORMATION OF MICROPOROSITIES IN THE GUT OF THE HONEY BEE <i>APIS MELIFERA</i> L. AT NOSEMATOSIS PROCESS 31
<b>Тяпша Ю.И.</b> ПОЛУЧЕНИЕ АНТИСЫВОРОТОК К АНТИГЕНАМ <i>MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE</i> , <i>MYCOPLASMA HYORHINIS</i> И <i>ACHOLEPLASMA LEIDLAVII</i> 36	<b>Tsiapsha Y.I.</b> OBTAINING ANTISERA TO ANTIGENS of <i>MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE</i> , <i>MYCOPLASMA HYORHINIS</i> AND <i>ACHOLEPLASMA LEIDLAVII</i> 36
<b>Рыженко В.П., Нычик С.А., Рыженко Г.Ф., Горбатьюк О.И., Андрияшук В.А., Жовнир А.М., Рудой А.В., Уховская Т.Н.</b> НАУЧНОЕ СОПРОВОЖДЕНИЕ ПРОФИЛАКТИКИ АЭРОБНЫХ, АНАЭРОБНЫХ И АССОЦИИРОВАННЫХ ИНФЕКЦИЙ 42	<b>Ryzenko V.P., Nychik S.A., Ryzenko G.F., Gorbatyuk O.I., Andriyashuk V.A., Zhovnr A.M., Rudoy A.V., Uhovskaya T.N.</b> THE SCIENTIFIC MAINTENANCE OF ANAEROBIC INFECTION PROPHYLAXIS 42
<b>Спиридонов В.Г., Ситюк Н.П., Мельничук С.Д., Гончаренко В.С., Нычик С.А., Красочко П.А.</b> МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ПО ИЗГОТОВЛЕНИЮ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФИТЦ-ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ДЛЯ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ 48	<b>Spiridonov V.G., Sytiuk N.P., Melnychuk S.D., Goncharenko V.S., Nychik S.A. Krasochko P.A.</b> METHODOLOGICAL APPROACHES FOR THE PRODUCTION OF SPECIFIC FITC- IMMUNOGLOBULIN FOR THE IMMUNOFLUORESCENCE DIAGNOSIS OF AFRICAN SWINE FEVER 48
<b>Якубовский М.В., Пахноцкая О.П., Zubovskaya, И.В.</b> ВЛИЯНИЕ КРИТОСПОРИДИОЗА ТЕЛЯТ НА ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ ПРОТИВ КОЛИБАКТЕРИОЗА, САЛЬМОНЕЛЛЕЗА И КЛЕБСИЕЛЛЕЗА 55	<b>Yakubovsky M.V., Pachnotskaya O.P., Zubovskaya I.V.</b> THE IMPACT OF CRYPTOSPORIDIOSIS AT VACCINE-INDUCED IMMUNITY AGAINST COLIBACILLOSIS, SALMONELLOSIS AND KLEBSIELLESIS. 55
<b>Плотницкий Д.С., Федотов Д.Н., Кучинский М.П., Орда М.С.</b> ПОСТИНКУБАЦИОННЫЙ МОРФОГЕНЕЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПЕРЕПЕЛОВ 62	<b>Plotnitskiy D.S., Fedotov D.N., Kuchinski M.P., Horde M.S.</b> POSTINTUBATION MORPHOGENESIS of the PANCREAS IN QUAILS 62
<b>Музыка А.А., Голодько И.В.</b> ЗООГИГИЕНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЕЗИНОВЫХ ПОКРЫТИЙ БОКСОВ ПРИ БЕСПРИВЯЗНОМ СОДЕРЖАНИИ ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ КОРОВ 67	<b>Musika A.A., Golodko I.V.</b> CENTURY ZOOHYGIENIC EVALUATION OF RUBBER COATINGS BOXES WITH FREE COW TRAFFIC, HIGHLY PRODUCTIVE COWS 67

Компьютерная верстка: ЛЕОНТЬЕВА Л. В.

ПОДПИСАНО В ПЕЧАТЬ 22.12.2014 г.  
 ФОРМАТ 60X84<sup>1/8</sup> БУМАГА ОФСЕТНАЯ. ГАРНИТУРА ТАЙМС.  
 УСЛ. ПЕЧ. Л 8,37 ТИРАЖ 100 ЭКЗ. ЗАКАЗ № 116

220003, г. Минск, ул. Брикета, 28. E-mail: biev@m@tut.by; KNIR@tut.by

Отпечатано на полиграфической базе группы научно-информационного анализа, стандартизации и патентных исследований РУП “ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМ. С.Н. ВЫШЕЛЕССКОГО”

Кривенок Л.Л., младший научный сотрудник  
Каменская Т.Н., кандидат ветеринарных наук  
Лукьянчик С.А., кандидат сельскохозяйственных наук

РУП "Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелецкого", г. Минск

## ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СРЕДСТВА ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕГО «КРИОКС»

### Резюме

*В статье представлены результаты изучения токсикологических показателей средства дезинфицирующего «Криокс».*

### Summary

*In the article presents results of a study of toxicological indicators of a disinfectant «Cryox».*

*Поступила в редакцию 02.10.2014 г.*

### ВВЕДЕНИЕ

Высокая эффективность ведения сельского хозяйства во многом должна обеспечиваться качественно новыми технологиями, гарантирующими получение конкурентоспособной продукции, пригодной для реализации как на внутреннем, так и на внешнем рынках.

В мероприятиях по предупреждению инфекционных заболеваний важная роль отводится специфической профилактике с использованием вакцин и иммунных сывороток, эффективность которых составляет 70 – 90%. Однако специфическая профилактика влияет только на одно звено эпизоотической цепи – организм животного и не затрагивает резервуары инфекции и факторы ее передачи. Поэтому для предупреждения возникновения, распространения и ликвидации инфекционных болезней важное значение имеет осуществление системы санитарно-противоэпидемических мероприятий, одним из звеньев которой является неспецифическая профилактика. Ведущее место в ней отводится дезинфекционным мероприятиям, обеспечивающим прерывание передачи инфекции путем уничтожения патогенных микроорганизмов на объектах внешней среды.

Снижение концентрации болезне-

творных микробов в помещениях для животных и птицы приводит к возможности сконцентрировать иммунные резервы поголовья на борьбу с заболеваниями [1, 2, 3].

К большинству из ранее применяемых дезинфицирующих средств в следствии их многолетнего использования выработалась адаптация и устойчивость микроорганизмов. Остатки ряда веществ кумулируются в организме животных [6]. Перспективными могут быть комплексные антимикробные препараты, созданные на основе пероксидов и других малоопасных веществ.

Возникает необходимость разработки экологически безопасных средств, пригодных для санации помещений в присутствии животных, которые одновременно оказывали бы лечебно-профилактическое действие.

На данном этапе исследований перед нами стояла **задача** провести токсикологическую оценку средства дезинфицирующего «Криокс».

Подбором наиболее оптимальных компонентов и их соотношений был приготовлен опытный образец средства дезинфицирующего с рабочим названием «Криокс», представляющий собой бесцветную, прозрачную жидкость, в состав которой входит перекись водорода, продукты каталитического взаимодействия органических кислот,

стабилизатор и вода деионизованная.

Средство дезинфицирующее «Криокс» обладает широким спектром антимикробного действия, воздействует на возбудителей основных инфекционных болезней животных, относящихся к первой, второй и третьей группам устойчивости к химическим дезинфицирующим средствам. Механизм действия средства дезинфицирующего «Криокс» заключается в его высокой окислительной активности. Выделяющийся кислород окисляет сульфгидрильные и гидроксильные группы белков и липидов, вызывая гибель возбудителей заболеваний.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа проводилась на базе РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», в лаборатории экологии и ветсанитарии и в виварии института.

Исследования по определению острой (при введении в желудок и ингаляционно) и хронической токсичности, аллергенных и раздражающих свойств образца средства дезинфицирующего «Криокс» проводили согласно «Методическим указаниям по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии» [4].

Острую токсичность при внутрижелудочном введении изучали на шести группах клинически здоровых мышей по 10 голов в каждой обоего пола массой  $19,0 \pm 1,0$  г. Мышам первой группы вводили раствор натошак в желудок в количестве 6000,0 мг/кг, второй группы – 5000,0 мг/кг, третьей – 4000,0 мг/кг, четвертой – 3000,0 мг/кг, пятой – 2000,0 мг/кг. Мышам шестой группы ввели натошак в желудок 0,5 мл физраствора. Наблюдение за животными вели в течение 14 суток. ЛД<sub>50</sub> рассчитывали по Кёрберу. Класс опасности средства дезинфицирующего определяли по ГОСТ 12.1.007 – 76.

Для определения хронической токсичности в опыте на белых мышах были сформированы 4 опытные группы. Животным

первой группы вводили в течение 16 дней внутрь 1/10 LD<sub>50</sub>, 2-ой группы – 1/25 LD<sub>50</sub>, 3-й – 1/50 LD<sub>50</sub> препарата. Четвертая группа животных была контрольной (вводили 0,5 мл физиологического раствора внутрь). При проведении опыта учитывали общее клиническое состояние организма подопытных животных, поедаемость корма, приросты живой массы и патолого-анатомические изменения в органах мышей после их автоназии по окончании опыта.

Для определения острой и хронической ингаляционной токсичности использовали методики, изложенные в трудах ВНИИВС [5]. Для этого белых мышей живой массой 18,0 – 20,0 г размещали в решетчатых клетках, которые ставили в герметически закрываемые камеры из стекла. Для получения аэрозолей использовали ручные распылители. Экспозиция обработки белых мышей аэрозолем средством дезинфицирующим «Криокс» при температуре окружающей среды 18 – 20 °С составляла 120 минут, после чего клетки с животными из камеры доставались. Острую ингаляционную токсичность препарата исследовали после однократных обработок животных с последующим наблюдением и вскрытием мышей через 14 дней. Рассчитывали среднюю летальную концентрацию препарата (ЛК<sub>50</sub>).

В хроническом опыте аэрозольную обработку животных в камерах проводили в течение 20 дней с интервалом 24 ч из расчета 1/10 и 1/20 ЛК<sub>50</sub>. В начале и конце опыта было проведено взвешивание мышей, а по окончании – патологоанатомическое вскрытие. Контрольная группа аэрозольным обработкам не подвергалась.

Местное раздражающее действие препарата на кожу изучали на кроликах. На выстриженные участки кожных покровов равномерно наносили 0,1 мл препарата в виде аппликаций в 3 % водном растворе и выдерживали в течение 4 часов. После этого за животными вели наблюдение в течение 14 дней. Контрольным животным на выстриженные участки кожи наносили дистиллированную воду.

Для изучения раздражающего действия препарата на слизистые оболочки и глаза провели опыт на 3-х кроликах живой массой  $2,0 \pm 0,5$  кг. Для этого в нижний конъюнктивальный мешок правого глаза наносили однократно изучаемый препарат в 1 % водном растворе, а в левый (контроль) – дистиллированную воду по 1–2 капли. За животными наблюдали в течение 2-х недель, первые 8 часов после инстилляций – ежечасно, а затем 1 раз в сутки. Регистрировали признаки раздражения слизистой оболочки, их выраженность и длительность, состояние век и давали оценку степени выраженности раздражающего действия препарата согласно таблице, приведенной в «Методических указаниях по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии» [4].

Для изучения сенсibiliзирующих свойств препарата провели опыт на 10 морских свинок живой массой  $250,0 \pm 50,0$  г. Животным опытной группы на один и тот же участок кожи в течение 15 суток наносили 3 % водный раствор препарата, контрольным – дистиллированную воду. После 14-дневного перерыва наносили на то же место разрешающую дозу в той же концентрации и в том же количестве. После нанесения разрешающей дозы препарата проводили учет реакции кожи через 24, 48 и 72 часа.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В опытах по изучению острой токсичности дезинфицирующего средства «Криокс» при его внутрижелудочном введении белым мышам установлено, что в первой группе (доза препарата 6000 мг/кг) пали все животные. Гибель мышей наблюдали в течение первых 10 минут после введения препарата. У животных отмечали выраженное возбуждение, одышку, цианоз видимых слизистых и кожи. Затем наступало глубокое угнетение, кома и смерть в результате асфиксии. Во второй группе (5000 мг/кг) падеж составил у 80 % голов. Гибель животных происходила при схожих явлениях

токсикоза, что и у мышей 1-й группы. Смерть наблюдалась в течение первого часа после введения. Оставшиеся в живых животные в течение 2 – 3 дней отказывались от корма, отмечались признаки адинамии, угнетения, затем их общее состояние постепенно улучшалось и на 7 сутки животные стали активно реагировать на внешние раздражители, охотно принимали корм и воду. В третьей группе (4000 мг/кг) падеж составлял 50 % мышей, гибель происходила при схожей клинике, что и у мышей 1 и 2 групп, однако признаки проявлялись в меньшей степени. Смерть животных наблюдали в течение 7–10 часов после введения препарата. Животные, оставшиеся в живых, в течение 2 дней отказывались от воды и корма, затем их состояние улучшалось и на 5 сутки они принимали корм и воду, адекватно реагировали на внешние раздражители. В четвертой группе (3000 мг/кг) отмечен падеж 20 % мышей. Смерть животных наблюдали в течение трех-пяти суток после введения препарата. Животные, оставшиеся в живых, в течение 2 дней отказывались от воды и корма, затем их состояние улучшалось и на 3 сутки они принимали корм и воду, адекватно реагировали на внешние раздражители. В пятой группе, как и в контрольной группе (шестой), падежа животных не отмечено. В течение всего опыта животные вели себя адекватно, охотно принимали корм и воду, реагировали на внешние раздражители (таблица 1).

При вскрытии павших мышей обнаруживали застойные явления в паренхиматозных органах, наблюдалась дистрофия печени, почек, желтушность слизистых оболочек, на слизистой желудка – кровоизлияния.

Среднесмертельную дозу определяли по формуле:

$$ЛД_{50} = ЛД_{100} - \frac{\sum(zd)}{m}, где$$

$z$  – половина суммы числа животных, павших от двух последующих доз;

d – разница в величинах двух последующих доз;

m – количество животных, взятых в опыте на каждую дозу.

В результате получено:

$$LD_{50} = 6000 - \frac{21000}{10} = 3900 \text{ (мг / кг)}$$

Таким образом, согласно ГОСТ 12.1.007 – 76 дезинфицирующее средство «Криокс» относится к III классу – умеренноопасным веществам.

В опыте по изучению хронической токсичности при внутрижелудочном введении белым мышам средства дезинфицирующего «Криокс» в течение 16 дней в дозе от 1/10, 1/25 и 1/50 LD<sub>50</sub> не вызвало изменений

в их поведении, общем состоянии и поедаемости корма. Среднесуточные приросты живой массы мышей в опытных группах были несколько ниже по сравнению с контролем. Так, при введении «Криокс» в дозе 1/10 LD<sub>50</sub> масса животного по группе была ниже на 1,1 г, при дозе 1/25 LD<sub>50</sub> – на 0,5 г, при дозе 1/50 LD<sub>50</sub> – на 0,3 г. При вскрытии мышей по окончании опыта патологических изменений во внутренних органах не обнаружено.

В опыте по изучению острой ингаляционной токсичности (ЛК<sub>50</sub>) для белых мышей установлено, что она составляла 2000 мл/м<sup>3</sup>, максимально недействующая доза – 1500 см<sup>3</sup>/м<sup>3</sup> (таблица 2).

Таблица 1 – Результаты опыта по определению острой токсичности препарата при внутрижелудочном введении белым мышам

Группа	Доза препарата, мг/кг	Количество животных, гол	из них			Примечание
			погибло	осталось живых	% гибели	
1	6000	10	10	0	100	признаки интоксикации (угнетение, вздутие живота, отказ от корма) и гибель проявлялись в первые 1 – 2 дня после введения препарата
2	5000	10	8	2	80	
3	4000	10	5	5	50	
4	3000	10	2	8	20	
5	2000	10	0	10	0	

Таблица 2 – Результаты определения острой ингаляционной токсичности препарата для белых мышей

Группа	Количество препарата, мл/м <sup>3</sup>	Экспозиция, мин	Количество животных			Примечание
			всего	пало	живых	
1	3000	120	6	6	0	симптомами интоксикации являлись угнетение, отказ от корма, учащенное дыхание, взъерошенность шерсти, гибель наступала в течение 1 – 3 дней
2	2500	120	6	4	2	
3	2000	120	6	3	3	
4	1500	120	6	0	6	

Ингаляционные обработки белых мышей в герметических камерах в течение 20 дней из расчета 1/10 и 1/20 ЛК<sub>50</sub> в виде 3 % водного раствора не вызывали изменений в поведении, общем состоянии животных и поедаемости корма.

При вскрытии животных после окончания опыта у подопытных мышей в легких отмечалась застойная гиперемия, в других внутренних органах видимые изменения отсутствовали. В контрольной группе мышей отклонений от нормы не обнаружено.

При изучении раздражающих свойств композиции препарата на кожу кроликов использовалась шкала, приведенная в таблице 3.

Таблица 3 – Классификация выраженности раздражающих кожу свойств

Классы	Среднегрупповой балл выраженности отека и эритемы	Выраженность местного раздражающего действия
1	0	отсутствие раздражающего действия
2	1,0 – 2,0	слабое раздражающее действие
3	2,1 – 4,0	умеренное раздражающее действие
4	4,1 – 6,0	выраженное раздражающее действие
5	6,1 – 8,0	резко выраженное раздражающее действие вплоть до некроза

Исследования раздражающих свойств показали, что однократное нанесение на кожу кроликов 3 % раствора композиции препарата реакции в виде эритемы или отека не вызывало. При аппликации нативной композиции препарата отмечалась незна-

чительная гиперемия, сухость, утолщение кожной складки, в среднем, через 15 минут на 2,2 мм и 60 минут на 2,1 мм, через 4 часа – на 1,2 мм, через 24 часа реакция кожи практически отсутствовала (таблица 4).

Таблица 4 – Толщина кожной складки при однократных аппликациях кроликам препарата «Криокс»

Время учета реакции	3% раствор			
	кролик №1	кролик №2	кролик №3	среднее
до нанесения	3,0	3,1	2,9	3,0
через 15 мин	3,0	3,2	3,0	3,06
60мин	3,1	3,2	3,0	3,1
4ч	3,0	3,1	2,9	3,0
16ч	3,0	3,1	2,9	3,0
24ч	3,0	3,1	2,9	3,0

Многokратное в течение опыта нанесение кроликам 3% раствора композиции препарата раздражения кожи не вызывало.

Оценку раздражающего действия композиции на слизистую оболочку проводили по шкале, приведенной в таблице 5.

Таблица 5 – Шкала повреждающего действия вещества на слизистую оболочку глаза кроликов

Показатель	Реакция глаза	Балл
выделения из глаз	отсутствие слезотечения	0
	минимальное слезотечение, исчезающее до 24 ч	1
	слезотечение, не исчезающее через 24 ч	2
	выделения увлажняют веки и окружающую кожу	3
гиперемия конъюнктивы и роговицы	Отсутствие гиперемии	0
	слабо выраженная гиперемия, исчезающая до 24 ч	1
	выраженная инъекция сосудов	2
	диффузное глубокое покраснение	3
отек век	отек отсутствует	0
	слабый отек, исчезающий до 24 ч	1
	выраженный отек, не исчезающий через 24 ч	2
	в результате отека глаз полузакрыт	3

Общая оценка раздражающего действия на слизистую оболочку глаза кролика проводилась по нижеследующим баллам: 0 – 0,4 – отсутствие раздражения; 0,5 – 3,0 – слабое раздражение; 3,1 – 5,0 – умеренное раздражение; 5,1 – 8,0 – выраженное раздражение; 8,1 – 9,0 – резко выраженное раздражение.

Установлено, что нанесение на слизистую оболочку глаза кроликов 1 % рабочего раствора препарата вызывало незначительную гиперемию конъюнктивы в течение первых часов, исчезающую – через 5 часов, разовая аппликация 3% рабочего раствора на слизистую оболочку глаза кроликов вызывала инъекцию сосудов. При дальнейшем наблюдении в течение 48 часов признаков раздражения глаз не наблюдалось.

Общая оценка раздражающего действия 1% рабочего раствора композиции препарата на слизистую оболочку глаза кроликов соответствует 1-ой группе – от-

сутствие раздражения.

Ежедневные накожные аппликации морским свинкам в течение 15 дней по 0,1 см<sup>3</sup> 3 % водного раствора препарата и нанесение после 14-дневного перерыва разрешающей дозы не вызывает изменений в реакции организма и состоянии кожного покрова, что говорит об отсутствии сенсibiliзирующих свойств.

## ВЫВОДЫ

1 Сконструированная композиция средства дезинфицирующего «Криокс» согласно ГОСТ 12.1.007 – 76 относится к III классу – умеренно опасным веществам.

2 Средство «Криокс» не обладает хронической внутрижелудочной и ингаляционной токсичностью.

3 Рабочие растворы средства дезинфицирующего «Криокс» обладают слабо раздражающими свойствами в опыте на кроликах и не сенсibiliзируют организм морских свинок.

## ЛИТЕРАТУРА

1 Бирман, Б.Я. Эффективность дезинфекции птичников, производственных цехов мясокомбинатов и доильного оборудования пероксидом оксон / Б.Я. Бирман [и др.]. – Ветеринарная медицина Беларуси. – 2004. – №6. – С.41– 43.

2 Кузнецов, А.Ф. Гигиена содержания животных: справочник. 2-е изд. – СПб.: Издательство «Лань», 2004. – С. 447–475.

3 Лях, Ю.Г. Влияние длительного периода эксплуатации животноводческих помещений на микробиологическое состояние объекта / Ю.Г. Лях [и др.]. – Ветеринарная медицина Беларуси. – 2004. – №4. – С. 10–11.

4 «Методические указания по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии» // Минск. – 2007.–156 с.

5 Скворцов, Ф.Ф. Методические подходы к оценке безопасности и токсических уровней воздействия аэрозолей химических веществ на сельскохозяйственных животных// Труды ВНИИВС. – 1985.– Москва. –С. 131–138.

6 Хуснутдинова, Л.С. Изыскание дезинфицирующих средств для аэрозольной санации воздушной среды птичников при выращивании племенного молодняка: Дисс. на соиск. ст. канд. биол. наук. – Казань, 1998.–133 с.



### **Вакцина «ПНЕВМОБАКТ» инактивированная эмульгированная против пневмонии телят**

- ♦ *вакцина включает штаммы бактерий, циркулирующие на территории Республики Беларусь;*
- ♦ *безопасна и иммуногенна;*
- ♦ *иммунитет развивается через 14 дней после вакцинации и сохраняется в течение 6 месяцев;*
- ♦ *обладает лечебным эффектом.*

Кучинский М.П., доктор ветеринарных наук, доцент

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск

## БИОЭЛЕМЕНТНЫЙ СТАТУС ОРГАНИЗМА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ ХОЗЯЙСТВ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ, СПОСОБЫ И СРЕДСТВА ЕГО КОРРЕКЦИИ

### Резюме

*В статье представлен анализ результатов лабораторного исследования сыворотки и плазмы крови крупного рогатого скота и свиней животноводческих предприятий Республики Беларусь за 2012–2013 гг. по содержанию биоэлементов и резервной щелочности.*

*Установлено широкое распространение нарушений биоэлементного обмена, причем среди них преобладают патологические состояния, обусловленные дефицитом жизненно необходимых макро- и микроэлементов.*

### Summary

*The data analysis of the laboratory examinations of blood serum and blood plasma for the content of bioelements and the alkalinity is presented in the article. The researches were conducted for cows and pigs in farms of Belarus from 2012 till 2013.*

*The article shows, that the disorders of the bio-elemental metabolism are widespread. The prevailing pathological condition caused by the deficiency of micro and macro elements which the animals need for normal life.*

*Поступила в редакцию 26.11.2014 г.*

Здоровье, продуктивность, воспроизводительная способность, а также сроки использования животных во многом зависят от их рационального питания, сбалансированности рационов по энергии, основным питательным и биологически активным веществам, в том числе по макро- и микроэлементам. Жизненная необходимость последних связана с тем, что они способны влиять на энергетические процессы организма, активировать или ингибировать действие многих витаминов, гормонов, ферментов, обеспечивая тем самым необходимую интенсивность метаболизма [5, 6, 8, 9].

Отличительной особенностью биоэлементов от других биологически активных веществ является то, что они не синтезируются в живых организмах, поэтому должны регулярно поступать извне с кормами, добавками, лекарственными препаратами, водой и воздухом.

Согласно нормам кормления рацион животных и птиц должен балансироваться по макро-(кальций, фосфор, магний,

натрий, калий, хлор и сера) и микро-(железо, цинк, медь, марганец, йод, кобальт и селен) элементам.

Установлено, что потребность скота и птиц в минеральных веществах зависит от многих факторов, прежде всего от возраста, вида, продуктивности, физиологического состояния, условий содержания, сезона года, химического состава почв и кормов региона, особенностей кормления и ветеринарного обслуживания [1, 2, 3, 7].

Основным источником макро- и микроэлементов для животных являются корма растительного и животного происхождения. Химический состав первых зависит от многих факторов, однако решающее значение имеет тип почв, поскольку земная кора, растения и организм животного являются неразрывно связанными звеньями единой миграционной цепи неорганических элементов [3].

В составе земной коры обнаружено большинство из известных в настоящее время химических элементов, из которых

восемь являются основными: кислород, кремний, алюминий, натрий, железо, кальций, магний и калий. Суммарное содержание этих элементов составляет 98,5 масс.%. При этом на долю нормируемых для животных макро- и микроэлементов приходится соответственно от 0,003 до 4,5 масс.% [9].

Профильным специалистам известно, что в связи с биогеохимическими особенностями почвы Республики Беларусь характеризуются низким содержанием таких эссенциальных биоэлементов, как кальций, фосфор, калий, железо, кобальт, медь, йод, селен, цинк и др. Поэтому их уровень в сене, силосе, сенаже, концентратах собственного производства недостаточен для удовлетворения потребности животных. Положение осложняется еще и тем, что в таких кормах минеральные вещества не сбалансированы, т.е. находятся далеко не в оптимальных соотношениях, а иногда представлены в виде труднорастворимых соединений [3, 5, 10].

Важным фактором обеспеченности организма животных биоэлементами является их способность взаимодействовать как между собой, так и с другими компонентами рациона по типу синергизма или антогонизма. Это взаимное влияние может происходить в корме, в желудочно-кишечном тракте и других органах, биологических жидкостях, а также в клетках и их структурах в процессе метаболизма. Как синергизм, так и антагонизм может быть односторонним или обоюдным. Характер взаимоотношений часто зависит от дозы компонентов. Например, при нормальном содержании марганца и йода антогонистических взаимоотношений между ними не наблюдается, но при избытке первого элемента накопление второго в щитовидной железе ингибируется. Высокие дозы меди, вызывая у свиней токсикоза, могут нарушать абсорбцию цинка и способствовать развитию паракератоза [12]. Доказано, что усвоение железа затрудняет избыточный уровень в рационе кальция, меди, а также соли фосфорной и фитиновой кислот [1, 5, 9].

Йодистый калий способен активно реагировать с солями меди, железа, хлоридами и органическими кислотами, приводя к частичной или даже полной потере их активности [11].

Известно, что дефицит в организме таких макроэлементов как натрий, калий, кальций и магний является одной из причин нарушения кислотно-щелочного равновесия в виде ацидоза и обмена веществ в целом. При избыточном образовании в организме кетоновых тел и других недоокисленных продуктов обмена накапливаются кислотные эквиваленты, для нейтрализации которых тратится много щелочных и щелочноземельных металлов, щелочных солей слабых кислот, некоторых аминокислот (аргинин, лизин, гистидин), а также других биохимически активных субстанций и их метаболитов [3, 6, 12].

Для оценки биоэлементного статуса организма животных предложено много методов и способов, но наиболее простым и доступным является исследование крови. Это связано с тем, что она является связующим звеном между всеми органами, тканями и клетками, а содержание в ней минеральных веществ в норме отличается определенной стабильностью.

**Целью** настоящего исследования явилось изучение распространения нарушений минерального обмена у животных сельскохозяйственных предприятий Республики Беларусь на основе анализа результатов исследования ветеринарными лабораториями проб сыворотки и плазмы крови крупного рогатого скота и свиней за 2012 и 2013 годы.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Работа проводилась в скотоводческих и свиноводческих хозяйствах Республики Беларусь, районных, межрайонных и областных ветеринарных лабораториях, ГУ «Белорусский государственный ветеринарный центр» и РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского».

Материалом для исследований служили пробы сыворотки и плазмы крови крупного рогатого скота и свиней различных возрастов и физиологических групп. Анализируемые показатели определяли в специализированных ветеринарных лабораториях с помощью общепринятых методик, автоматических биохимических анализаторов и атомно-абсорбционных спектрометров.

При оценке физиологических параметров анализируемых показателей руковод-

ствовались данными справочного издания [4].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализируемые показатели, количество проб и полученные результаты отклонений от нормативных физиологических показателей биохимического исследования крови крупного рогатого скота животноводческих предприятий республики представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты исследования сыворотки и плазмы крови крупного рогатого скота хозяйств республики по содержанию биоэлементов и показатель резервной щелочности за 2012–2013 гг.

Показатель	Количество проб крови и анализируемый год					
	всего		выше нормы, %		ниже нормы, %	
	2012г	2013г	2012г	2013г	2012г	2013г
кальций общий	255815	263011	0,6	3,1	28,4	28,5
фосфор неорганический	251666	260458	7,2	6,6	13,0	13,6
магний	19915	24733	2,9	5,0	24,8	26,7
калий	5946	7499	11,6	5,4	32,4	33,1
натрий	4670	5146	14,6	16,9	29,2	39,8
хлориды	5769	8225	7,1	1,2	20,1	16,4
резервная щелочность	220108	235149	0,8	1,2	13,0	12,7
железо	8455	12857	2,2	3,2	24,5	19,3
медь	3640	3404	1,4	1,1	37,6	41,9
цинк	215	–	9,3	–	60,9	–

Из данных таблицы 1 видно, что из происследованных 255815 проб крови крупного рогатого скота в 2012 году и 263011 в 2013 году более чем у 28% животных выявлен дефицит кальция, а доля с содержанием данного элемента выше референтных значений составила соответственно лишь 0,6% и 3,1%. Последствия недостатка кальция вытекают из его физиологической роли, они могут проявляться как на уровне всего организма, так и отдельных систем (угнетение иммунитета, нарушение походки и роста молодняка, передачи нервных импульсов, снижение прочности костей, зубов и свертываемости крови, кровоточивость и др.).

Гиперфосфатемия, по сравнению с гиперкальциемией, диагностируется чаще, тем не менее, количество проб крови круп-

ного рогатого скота с низким содержанием данного элемента также выявляется чаще (13,0–13,6%).

Дефицит фосфора проявляется, прежде всего, слабостью (из-за нарушения синтеза АДФ и АТФ), низкой устойчивостью к возбудителям инфекционных болезней, нарушением белоксинтезирующей функции печени.

Огромное значение имеет оптимальное соотношение в рационе кальция и фосфора. Следует отметить, что метаболизм кальция и фосфора в организме животных во многом зависит от их обеспеченности витамином D. Кроме того, в обеспечении гомеостаза кальция важная роль принадлежит паратгормону и кальцитонину.

В среднем за 2012–2013 гг. доля животных с низким значением магния в

крови составила 25,75%. Таким образом, гипомагниемия диагностируется в 6,5 раза чаще, чем метаболические нарушения, обусловленные повышенным содержанием данного элемента (3,95%).

При недостаточности магния нарушается функционирование миокарда и скелетных мышц, обмен кальция, калия и натрия, а также высвобождение АТФ, снижается нервно-мышечная проводимость, иммунитет, отмечаются судороги мышц и гипокальциемия.

Избыточное содержание в крови калия обнаруживается у 5,4–11,6% крупного рогатого скота. Следует обратить внимание на то, что у значительного количества животных данного вида (32,4–33,1%) диагностируется гипокалиемия, хотя широко распространено мнение о том, что дефицит в рационе калия довольно редкое явление. Недостаточность калия, прежде всего, сопровождается мышечной слабостью, угнетением роста молодняка, функциональными нарушениями со стороны сердца и почек.

Натрий поступает в организм крупного рогатого скота преимущественно в виде поваренной соли, которая должна постоянно присутствовать в их рационе. Тем не менее, от 29,2 до 39,8% животных испытывают дефицит этого жизненно необходимого элемента. При недостатке хлористого натрия отмечаются тяжелые расстройства, проявляющиеся слабостью, поносами, выпадением волос, истощением, нарушением гемодинамики, угнетением ЦНС, судорогами. Следует также отметить, что у сравнительно большого количества крупного рогатого скота (14,6–16,9%) обнаруживается гипернатриемия. Она может сопровождаться нарушениями со стороны ЦНС, надпочечников, почек, а также жаждой, отеками и остеопорозом.

При анализе обеспеченности данного вида животных хлоридами следует отметить существенные (в 5,9 раза) различия в количестве проб с их превышением в 2012 и 2013 гг. Тем не менее, как и при анализе

содержания в крови вышеописанных элементов количество крупного рогатого скота с дефицитным содержанием в крови хлоридов гораздо больше и составляет 16,4 – 20,1% обследованного поголовья. При недостатке в организме хлоридов отмечается снижение живой массы, нарушение моторики желудочно-кишечного тракта, алкалоз.

В среднем за анализируемые годы превышение физиологических уровней резервной щелочности выявлено лишь у 1% крупного рогатого скота. При этом низкие значения данного показателя диагностируются у 12,7–13,0% животных данного вида.

Как видно из таблицы 1 железodefицитные состояния у крупного рогатого скота довольно широко распространены, поскольку у 19,3–24,5% из них отмечается гипосидеремия. На всасывание железа в желудочно-кишечном тракте животных влияют многие факторы: его валентность, содержание в рационе солей кальция, фосфора, фитинов и витамина С. Известно, что двухвалентное железо всасывается лучше, оно содержится в кормах животного происхождения. В растительных кормах находится железо трехвалентное, которое в организме должно преобразоваться в двухвалентное. Причем этот процесс в значительной степени зависит от кислотности среды метаболизма.

Высокий уровень железа в крови диагностируются только у 2,2–3,2% животных. Тем не менее, избыток данного элемента для организма животных ещё хуже, чем дефицит и устранить его сложнее, чем недостаток.

При неадекватной обеспеченности железом развивается анемия, поскольку данный элемент является важным компонентом гемоглобина, миоглобина и многих гемсодержащих ферментов. Последние необходимы для осуществления процессов дыхания на клеточном уровне.

Ещё хуже обстоять дела с обеспеченностью скота медью, так как у 37,6–41,9% животных обнаруживается её дефицит.

Метаболизм данного элемента тесно связан с обменом железа. При недостатке меди снижается активность многих ферментов, ухудшается всасывание и транспорт железа, а также нарушается синтез гемоглобина, нарушается прочность коллагена и образование костной ткани.

Следует отметить, что гиперкупроз диагностируется только у 1,1–1,4% крупного рогатого скота, тогда как недостаточное содержание меди в крови выявлено у 37,6 – 41,6 % животных. Так же как и дефицит, избыток меди может быть причиной анемии у животных.

Результаты исследования крови за 2012 год свидетельствуют о том, что у

60,9% животных обнаруживается низкий уровень такого эссенциального элемента, как цинк. Кроме низкой обеспеченности рационов цинком на его усвоение негативно влияет высокое содержание в кормах кальция, растительных белков, фитиновой кислоты. Последняя и её метаболиты (фитаты) содержатся в большем количестве в злаках. Следует отметить также, что у 9,3% крупного рогатого скота концентрация цинка в крови превышает референтные значения. Несмотря на относительно невысокую токсичность данного элемента, избыток цинка в рационе нежелателен, особенно при дефиците железа и меди.

Таблица 2 – Результаты исследования сыворотки и плазмы крови свиней хозяйств республики на содержание биоэлементов и показатель резервной щелочности за 2012–2013 гг.

Показатель	Количество проб крови и анализируемый год					
	всего		выше нормы, %		ниже нормы, %	
	2012г	2013г	2012г	2013г	2012г	2013г
кальций общий	21581	25218	0,7	1,9	21,7	18,8
фосфор неорганический	21141	24766	5,8	10,5	14,1	10,4
магний	1992	2530	4,7	8,4	34,5	30,5
калий	297	1312	21,4	6,1	24,8	2,5
натрий	556	952	29,3	34,7	27,3	47,8
хлориды	565	442	8,1	6,1	24,8	25,9
резервная щелочность	17954	16069	1,1	1,2	9,4	9,1
железо	1217	1659	7,8	1,5	62,2	46,9
медь	429	495	0,9	0	21,9	31,7
цинк	85	–	9,4	–	21,2	–

Данные таблицы 2 свидетельствуют о том, что нарушения биоэлементного статуса организма у свиней также широко распространены. При этом следует отметить, что количество проб крови, в которых анализируемые показатели не соответствуют нижним значениям нормы, значительно преобладают по сравнению с теми, что её превышают. Так, из 21581 и 25218 проб крови, исследованных в 2012 и 2013 годах, гиперкальциемия диагностировалась только у 0,7 – 1,9%. В то же время дефицит кальция обнаружен у 18,8 – 21,7% животных.

В 2012 году количество проб крови свиней с дефицитом фосфора было в 2,4 раза больше, чем с повышенными показате-

лями, а в 2013 году отклонения в обе стороны от референтных значений по данному элементу были практически одинаковыми, но общее количество выявленных нарушений было на 10% выше, чем в 2012 году.

Количество животных данного вида с гипермагниемией в 2012 и 2013 годах составило соответственно 4,7 и 8,4%. Но дефицит этого элемента выявляется более чем у 30% свиней.

Анализируя результаты исследований крови животных по содержанию калия, следует отметить существенные различия по годам. Так, в 2012 году, по сравнению с 2013 годом, был обнаружен значительно больший процент проб как с высокими (21,4%), так и с низкими (24,8%) значения-

---

ми этого элемента.

Количество свиней в 2012 году с гипернатриемией было лишь на 2% больше, чем с низким уровнем натрия. В 2013 году, напротив, доля животных с гипонатриемией была на 13,1% больше, чем с высокими значениями данного элемента.

По содержанию хлоридов в крови свиней за анализируемые годы существенных различий не отмечено. Те не менее, их дефицит диагностируется в 3,1–4,2 раза чаще, чем высокий уровень.

Показатели резервной щелочности плазмы крови свидетельствуют о том, что более чем у 9% свиней регистрируются изменения кислотно-щелочного равновесия, обусловленные избыточным накоплением в организме органических кислот в следствие метаболических нарушений на фоне погрешностей в кормлении, которые обусловлены в том числе и дефицитом в рационе кальция, магния, натрия, калия и других биоэлементов.

Количество проб крови в 2013 году с превышением стандартного значения по железу, установленного для данного вида животных, составило лишь 1,5%, хотя годом ранее этот показатель был значительно выше – 7,8%. Доля свиней с низким уровнем железа также была на 15,3% выше, чем в 2012 году. Таким образом, у 70% животных данного вида регистрировались нарушения обмена железа в 2012 году. В 2013 году доля животных с отклонениями референтных значений по этому показателю была значительно меньше – 48,4%.

У свиней, также как и у крупного рогатого скота, высокое содержание меди в крови обнаруживается сравнительно редко, а дефицит данного элемента диагностируется у 21,9 – 31,7% животных.

В отличие от меди, высокий уровень цинка в крови свиней выявляется значительно чаще, о чем свидетельствуют 9,4% проб крови с превышением стандартного значения по данному элементу. Тем не менее, доля проб крови с дефицитом цинка по сравнению к высоким показателям в 2012 году была больше на 11,8%.

Таким образом, анализ результатов исследования ветеринарными лабораториями проб крови крупного рогатого скота и свиней сельхозпредприятий республики за 2012 и 2013 годы показал, что биоэлементозы имеют широкое распространение, причем среди них преобладают те, что обусловлены дефицитом нормируемых в рационе макро- и микроэлементов (гипобиоэлементозы). Охватывая большое поголовье, они часто протекают сочетанно, нарушая функции многих органов и систем организма, что негативно сказывается на здоровье и продуктивности животных. Во многом это связано с биогеохимическими особенностями наших почв, интенсивным их использованием, несоблюдением агротехники, различными экологическими проблемами, а также с недостаточным применением животным минеральных подкормок, премиксов и БВМД, нарушением технологий их выращивания и кормления, условий эксплуатации.

Последствия дефицита биоэлементов в организме животных могут быть самыми разнообразными – от снижения аппетита, продуктивности и до специфической патологии (остеомалация, рахит, эндемический зоб, беломышечная болезнь, паракератоз, железodefицитная анемия и др.), часто сопровождаемой массовой гибелью. Всего в настоящее время описано более 30 нозологических единиц, обусловленных нарушением минерального обмена. Наиболее подвержены болезням минеральной недостаточности молодняк, беременные самки и высокопродуктивные животные.

Следует отметить, что биоэлементозы животных часто не имеют характерных клинических признаков, а проявляются расстройством обмена веществ, снижением продуктивности, темпов роста, неспецифической резистентности и иммунной реактивности. На таком фоне отмечается низкая эффективность применения вакцин, повышенный расход кормов на единицу продукции и высокая общая заболеваемость. Минеральная недостаточность сопровождается также нарушением воспроизводительной

функции самцов и самок, бесплодием, малоплодием, рождением слабого, нежизнеспособного молодняка, который часто заболевает и гибнет в первые дни жизни. С учетом этого животноводческие предприятия республики ежегодно несут большие прямые и, особенно, косвенные потери.

Для животных важным источником большинства биоэлементов являются растительные корма. Но на состав в растениях минеральных веществ влияют многие факторы: фаза их развития, сроки уборки, технология заготовки кормов, погодные условия, рН и тип почвы, содержание в ней различных отложений, химических элементов, объемов внесения извести и удобрений.

Биодоступность макро- и микроэлементов из растительных кормов для организма животных, прежде всего, зависит от растворимости в воде соединений, в которых они находятся. Но в целом растения бедны минеральными веществами, тем не менее, при составлении рационов следует учитывать их ботанический состав. Так, сравнительно высокий уровень кальция имеет сено из клевера и люцерны – 12–14 г/кг сухого вещества, что в 2,5–3,0 раза больше, чем, например, в кукурузном силосе. Для балансирования рационов животных по кальцию широко используются такие минеральные подкормки, как мел, известняк, крупа кормовая из раковин моллюсков, обесфторенный фосфат, моно- и дикальций фосфат, в которых массовая доля чистого элемента составляет от 18 до 35%. В растениях кальций связан с белками и анионами органических кислот, а в добавках – с анионами карбоната или фосфата.

В зерновых и зернобобовых культурах содержание фосфора составляет от 3 до 6,5 г/кг, что в целом выше, чем магния, кальция и натрия, но меньше, чем калия. Относительно богаты данным элементом шроты, жмыхи и отруби (8 – 18 г/кг). Но основным источником фосфора является костная мука, в которой содержание элемента составляет около 120 г/кг. Из минеральных подкормок в качестве источника фосфора чаще используют монокальций-

фосфат, динатрий-, дикальций- и диаммонийфосфат, обесфторенный фосфат, в которых массовая доля чистого элемента составляет от 13 до 22%.

К сравнительно неплохим источникам магния можно отнести отруби, жмыхи, шроты, подсолнечник, ботву кормовой и сахарной свеклы (4–8 г/кг).

В силосе натуральной влажности из трав, клевера, люцерны уровень калия может составлять до 25 и более г/кг, в сене и соломе – 12–18 г/кг. Хорошим источником данного элемента являются зерновые и зернобобовые культуры, а также продукты их переработки. Так, сравнительно много калия содержится в кукурузе, горохе, бобах и сое (8–20 г/кг), шроте соевом (15 г/кг), жмыхе льняном и отрубях пшеничных (11–12 г/кг). Из сочных кормов больше всего калия содержится в люцерне, клевере красном, свекле кормовой, вико-овсяной смеси – от 3,6 до 4,8 г/кг.

Известно, что натрий растениями накапливается в небольших количествах. Из зерновых и зернобобовых культур больше всего данного элемента содержит соя и овес, соответственно 3,5 и 1,3 г/кг. Из сочных кормов натрием наиболее богата морковь (0,9 г/кг) и сахарная свекла – 1,4 г/кг. Но все же основным его источником, особенно для крупного рогатого скота, является натрия хлорид.

Из зерновых наиболее богаты хлором ячмень, пшеница и кукуруза (от 0,6 до 1,2 г/кг). Неплохим источником элемента является силос – 5,5 – 6,0 г/кг (но в кукурузном примерно в два раза меньше) и солома – от 8 до 12 г/кг.

Силос и сено хорошего качества содержат сравнительно высокий уровень марганца.

К ценным источникам многих нормируемых макро- и микроэлементов относятся корма животного происхождения (костная, мясо-костная, кровяная и рыбная мука, сухие обрат и сыворотка).

Для диагностики нарушений минерального обмена чаще всего прибегают к

---

исследованию крови, но для получения более объективных данных она должна быть комплексной, т.е. необходимо учитывать анамнез, условия кормления и содержания животных, клиническую картину и патологоанатомические изменения, результаты лабораторного анализа кормов, воды, почвы, молока, мочи, шерстного покрова, внутренних органов, костей на содержание химических элементов.

Бесспорно, что самый оптимальный способ решения проблемы минерального питания животных – назначение им сбалансированных рационов, согласно нормам кормления. Однако по разным причинам в практике отечественного животноводства это происходит далеко не всегда. Следует учитывать и то, что в составе комбикормов и кормовых добавок некоторые минеральные элементы слабо сохраняются, а также способны образовывать малоусваиваемые и неусваиваемые соединения друг с другом и другими компонентами рационов.

Поэтому в последние десятилетия во многих странах мира значительно возрос интерес к разработке комплексных препаратов на основе биологически активных веществ. Включение их в схемы лечебно-профилактических мероприятий позволяет не только восполнить в организме дефицит жизненно необходимых компонентов питания, но и повысить сохранность животных, показатели продуктивности, качество и безопасность получаемой продукции. С учетом этого во многих странах с развитым животноводством исследования, направленные на разработку средств и способов оптимизации биоэлементного баланса организма животных, относятся к наиболее приоритетным направлениям.

Сотрудниками РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского» также проводятся исследования по изысканию эффективных комплексных препаратов для нормализации минерального гомеостаза организма животных. Их результаты уже позволили внедрить в практи-

ку ветеринарной медицины ряд лекарственных средств на основе химических элементов и других биологически активных веществ (деструмин, КМП, КМП плюс, тетраминерал, седиминум плюс, солеминерал, мультивит, дифсел, неоветселен, гексамин, антимиопатик и т.д.).

Проблема адекватного обеспечения животных химическими элементами имеет также важный санитарный и социальный аспект, поскольку от их содержания в кормах, назначаемых животным и птице, зависит накопление этих биологически активных веществ в яйце, молоке, мясе и других продуктах убоя.

## **ВЫВОДЫ**

1 Анализ результатов биохимического исследования проб крови свиней и крупного рогатого сельхозпредприятий Республики Беларусь за 2012 и 2013гг. свидетельствует о широко распространенных нарушениях у них биоэлементного обмена, среди которых преобладают патологические состояния, обусловленные дефицитом в рационе нормируемых макро- и микроэлементов.

2 Для контроля за минеральным обменом в организме животных необходимо систематически контролировать качество и химический состав кормов, проводить биохимические исследования крови, молока, мышц и внутренних органов, анализировать полученные результаты и своевременно вносить в рацион необходимые коррективы.

3 Для балансирования рационов животных по содержанию макро- и микроэлементов и восстановления биоэлементного баланса следует учитывать особенности химического состава растительных кормов, шире применять премиксы, белково-витаминно-минеральные добавки и ветеринарные препараты на основе биологически активных веществ согласно инструкциям по их применению.

---

## ЛИТЕРАТУРА

- 1 Венедиктов, А.М. Химические кормовые добавки в животноводстве: справочная книга / А.М. Венедиктов, А.А. Ионас. – М.: Колосс, 1979. – 160 с.
- 2 Витаминно-минеральное питание племенных бычков и быков-производителей: монография / М.М. Карпеня [и др.]. – Витебск: ВГАВМ, 2012. – 104 с.
- 3 Георгиевский, В. И. Минеральное питание животных / В. И. Георгиевский, Б. Н. Анненков, В. Т. Самохин. – М.: Колосс, 1979. – 471 с.
- 4 Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии: справочное издание / И.П. Кондрахин [и др.] – М.: Агропромиздат, 1985. – 287 с.
- 5 Книга Waltham о кормлении домашних животных / Д. Булс [и др.]. Под редакцией А. Бурге-ра – М.: Пальма пресс, 2001. – 152 с.
- 6 Кучинский, М.П. Биоэлементы – фактор здоровья и продуктивности животных: монография / М.П. Кучинский. – Минск : Бизнесофсет, 2007. – 372 с.
- 7 Результаты мониторинга биоэлементов в почве, кормах, организме животных и состояние обмена веществ у крупного рогатого скота / Д.А. Гирис, М.П. Кучинский [и др.]. // Экология и животный мир. – 2009. – № 1. – С. 48–60.
- 8 Скальный, А. В. Биоэлементы в медицине / А. В. Скальный, И. А. Рудаков. – М.: «Издательский дом «Оникс 21 век»: Мир, 2004. – 272 с.
- 9 Сусликов, В. А. Геохимическая экология болезней / В. А. Сусликов. – М.: Гелиос АРВ, 2000. – Вып. 4: Атомовиты, Т. 2. – 672 с.
- 10 Таранов, М.Т. Биохимия кормов / М.Т. Таранов [и др.]// М.: Агропромиздат, 1987. – 224 с.
- 11 Тимофеев, Б.А. Профилактика лекарственных осложнений у сельскохозяйственных животных / Б.А. Тимофеев. – М.: Росагропромиздат, 1989. – 160 с.
- 12 Чернышев, Н.И. Кормовые факторы и обмен веществ / Н.И. Чернышев, И.Г. Панин, Н.И. Шумский.–Воронеж: ГУП «Воронежская обл. типография им. Е.А. Болховитинова», 2007. – 188 с.

**УДК:619:616.98:579.844.12-084**

**Джупина С.И.**, доктор ветеринарных наук, профессор

*Российский университет дружбы народов, г. Москва*

### **ОСОБЕННОСТИ ПРОФИЛАКТИКИ НЕКРОБАКТЕРИОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА (ОБЗОР)**

#### ***Резюме***

*Случаи заболевания животных некробактериозом предупреждают не использованием различных препаратов, а знаниями его эпизоотического процесса, знаниями резервуара и источника возбудителя инфекции, путей и механизмов его передачи, пускового механизма и движущей силы эпизоотического процесса. Разумеется, очень важно уметь использовать эти знания и применять их в конкретных хозяйственных условиях.*

#### ***Summary***

*The animal cases necrobacteriosis not warn the use of different drugs, but his knowledge of epizootic process, knowledge of the reservoir and source of the pathogen, ways and mechanisms of its transfer, the trigger mechanism and motive power of epizootic process. Of course, very important to be able to use this knowledge and apply them in specific economic conditions.*

*Поступила в редакцию 17.09.2014 г.*

В последние десятилетия заболевание водства. Руководствуясь классическим по-  
крупного рогатого скота некробактериозом ниманием инфекционной патологии, вете-  
стало серьезным тормозом на пути успеш- ринарные специалисты прикладывают  
ного развития молочного и мясного ското- много усилий на разработку различных

---

лекарственных препаратов для её лечения и специфической профилактики.

Ведущими учеными всего мира регулярно через каждые 2 – 3 года уже 17 раз обсуждалась эта проблема на международных симпозиумах и конференциях. Названо 89 факторов риска, и все они находятся в сфере среды содержания животных. По мнению участников симпозиумов и конференций, эта среда создается для удобства человека, а не для комфорта животных [1].

На конференциях и симпозиумах предложено понятие «коровий комфорт» и условия, его обеспечивающие. По нашему мнению деятельность в сфере этого понятия позволит обеспечить профилактику некробактериоза. И все же на одном из последних симпозиумов прозвучало, что «за прошедшие 20 лет мало что удалось сделать для решения проблемы хромоты продуктивных животных».

Не менее показательны признания отечественных исследователей [2]. Они подтвердили, что за 22 года исследований в нашей стране и за рубежом до настоящего времени продолжается стабильный рост заболеваемости крупного рогатого скота «хромотой» и некробактериозом, несмотря на наличие широкого арсенала лечебно-профилактических препаратов. И в этой же статье они утверждают, что «в период проведения плановой вакцинопрофилактики некробактериоза с помощью формол-эмульсионной вакцины отмечается стойкое благополучие хозяйств, и новых случаев заболевания инфекционной этиологии не наблюдается.

С нашей точки зрения, если применение вакцины столь эффективно, то заболеваемость должна сокращаться так как это произошло с сибирской язвой, стригущим лишаем и другими подобными болезнями. Но такое не происходит. Судя по тексту статьи, авторы располагают действительно эффективным лечебным препаратом – фузобаксан. Но это все же лечебный, а не профилактический препарат.

Все это убедительно доказывает, что проводимые против этой болезни профи-

лактические мероприятия не адекватные её эпизоотическому процессу. Чтобы понять, какой должна быть профилактика некробактериоза надо учитывать отличительные особенности эпизоотологического процесса этой болезни от классических инфекций. Рациональная эпизоотологическая классификация болезней животных [3] относит некробактериоз к категории факторных инфекционных болезней, эпизоотическому процессу которых не свойственна эстафетная передача возбудителя инфекции. Только это подчеркивает, что меры контроля над его проявлением существенно отличаются от тех мер, какие весьма эффективно предупреждают появление и распространение болезней, возбудители которых проникают к животным горизонтальным путем извне.

Проблема профилактики некробактериоза крупного рогатого скота успешно решается при учете особенностей эпизоотического процесса этой инфекции. Это стало возможным после проведения фундаментальных исследований некробактериоза [4].

Рассмотрим особенности этого процесса. Хорошо известно, что возбудителем некробактериоза является *Fusobacterium necrophorum*, который является облигатным обитателем желудочно-кишечного тракта жвачных животных. В процессе жизнедеятельности эти микроорганизмы способствуют расщеплению и усвоению грубых кормов. В желудочно-кишечном тракте животного постоянно находятся миллиарды таких микробов. К сожалению, ветеринария не располагает данными, какой удельный вес занимают энтеральные микробы по отношению к весу животного. Хотя академик А.А.Воробьев уже показал, что к весу человека их удельный вес достигает 2%.

Таким образом, резервуаром возбудителя некробактериоза является желудочно-кишечный тракт жвачных животных, из которого происходят массовое рассеивание этого микроорганизма в местах содержания животных. Это совершенно безобидный процесс при нормальном состоянии здоровья животных. Но если животное травмирует нижнюю часть конечности, то в рану

---

свободно проникает возбудитель некробактериоза в анаэробных условиях подкожных тканей формирует некротический очаг [5]. Такая ситуация хорошо известна ветеринарным врачам, и у них не возникает мысль профилактить эту патологию с помощью вакцинации.

Разумеется, фенотипические и генотипические признаки возбудителя некробактериоза в желудочно-кишечном тракте и анаэробных условиях подкожных тканей несколько отличаются. Но это не значит, что для профилактики этой патологии необходимо конструировать и использовать вакцины, а также выявлять и оценивать структуру активных участков ДНК этого микроорганизма [6]. Вполне достаточно для профилактики этой патологии создавать такие условия содержания животных, при которых исключались бы любые травматические воздействия на них. Единичные случаи такого заболевания решаются профессиональным вмешательством ветеринарного врача. Это травматический некробактериоз. Но ветеринарную общественность и владельцев продуктивного скота беспокоят ситуации, когда патологию регистрируют у большого числа животных, а травмы у них вообще не регистрируются. Их беспокоит эпизоотический некробактериоз.

Эпизоотологические наблюдения, обследования и опыты показали, что пусковой механизм эпизоотического процесса такого варианта некробактериоза аналогичен пусковому механизму травматического некробактериоза. Фактором, порождающим эту болезнь и пусковым механизмом её эпизоотического процесса, являются дефекты кожного покрова. Но ведущим условием болезни является потеря непроницаемости кожного покрова, как неспецифического фактора защиты. Через кожу, потерявшую защитные свойства энтеральная и накожная микрофлора свободно проникает в подкожные ткани. И если возбудитель некробактериоза вызывает некротический процесс, то представители другой микрофлоры – различные абсцессы.

Способствуют развитию эпизоотического процесса при некробактериозе крупного рогатого скота ослабление общей резистентности животных и нарушение функционирования желез эндокринной секреции [7, 8], которые обеспечивают усвоение из кормов минеральных веществ и витаминов. При дисбалансе в рационе жвачных животных, особенно при низком содержании грубых кормов нарушается поступление в организм кальция и других минеральных веществ и витаминов. Если же тонкий отдел кишечника воспалён, не происходит всасывание этих веществ из кормового рациона, и они выделяются с экскрементами во внешнюю среду. В обоих случаях организм животного вынужден поставлять эти вещества в сыворотку крови за счет изъятия их из кожи, суставов, костей.

Пусковым механизмом эпизоотического процесса при некробактериозе является потеря кожным покровом естественной непроницаемости. Такая непроницаемость зависит от уровня обеспеченности организма животных кальцием. В сыворотке крови здорового животного он поддерживается на уровне 10 – 20 мг%. Надо учитывать, что потребность кальция в организме жвачных животных возрастает и уровень непроницаемости кожного покрова снижается, прежде всего, у глубоко стельных животных, поскольку организмом коровы расходуется много кальция для формирования плода. Высокий расход этого элемента и у высокоудойных животных. В такой же степени сокращается непроницаемость кожного покрова у молодых развивающихся животных, поскольку их организм расходует много кальция на формирование костной ткани, хрящей и кожи.

Обмен кальция регулируют два гормона: паратгормон, синтезируемый паращитовидной железой, и кальцитонин, синтезируемый щитовидной железой. Кальцитонин обеспечивает нормальное содержание кальция в сыворотке крови за счет его поступления из кормов. Всасыванию этого минерального вещества способствует гормонально активная форма витамина Д<sub>3</sub>.

---

Если в кормовом рационе не достаточно кальция или нарушен процесс его всасывания из кишечника, то паразитовидная железа начинает синтезировать паратгормон, который обеспечивает поддержание физиологического содержания этого минерала в сыворотке крови за счет высвобождения его из кожи, хрящей и костной ткани. При этом наблюдается размягчение хвостовых позвонков и узур на гиалиновой поверхности суставов.

Следует только напомнить, что повышенная влажность в месте расположения конечностей животных также увеличивает вероятность потери кожей непроницаемости.

К сожалению, мы не располагаем клиническими или лабораторными методами, с помощью которых можно было бы оценить степень непроницаемости кожного покрова и установить тот критический уровень, при котором этот покров её теряет. Но каждому ветеринарному врачу доступны косвенные, весьма убедительные критерии, позволяющие оценивать уровень минерально-витаминового обмена, что бы принимать меры для его нормализации. Таким критерием является заметное ослабление жвачки и работы преджелудков, а также катаральное или серозно-катаральное воспаление слизистой оболочки тонкого отдела кишечника. Эта патология хорошо просматривается при разделке туш убитых животных или при вскрытии трупов. Есть основание полагать, что уровень воспаления тонкого отдела кишечника коррелирует с понижением рН рубца от физиологически нормального 6,8 – 7,4 до 5,9 и ниже.

Вторым, не менее убедительным критерием нарушения минерально-витаминового обмена является оценка гиалиновой поверхности путового, карпального и других суставов. К сожалению, при разделке туш и вскрытии трупов животных ветеринарные врачи редко обращают внимание на степень поражения гиалиновой поверхности суставов. Но наличие на их поверхности узур в сочетании даже с незначительным воспалением слизистой оболоч-

ки тонкого отдела кишечника убедительно говорит о глубоком нарушении витаминно-минерального обмена и является верным предвестником заболевания животных некробактериозом. Уместно напомнить, что надзор над этой патологией для диагностики некробактериоза нельзя ограничивать просмотром единичных животных.

Коль скоро это так, то, рассматривая причины и пусковой механизм эпизоотического процесса некробактериоза, надо знать причины хронического воспаления тонкого отдела кишечника. Эта патология в современных условиях распространена довольно широко. Она предрасполагает к патологическим изменениям конечностей, к заболеванию маститами, эндометритами и другими факторными инфекционными болезнями.

Система пищеварения жвачных животных рассчитана на восприятие и переработку больших объёмов грубых кормов. Они не только питательные вещества, но и стимуляторы работы желёз внутренней секреции, обеспечивающих всасывание. Заниженный объём в рационе грубых кормов и замена их концентратами и кислым силосом неизбежно ведёт к серозно-катаральному и катаральному воспалению слизистой оболочки тонкого отдела кишечника.

Обязательным условием при кормлении жвачных является ежедневное введение в рацион не менее 6 – 9 кг качественного сена. Балансирование рациона кормления жвачных животных по питательным веществам надо решать за счет бобовых трав (люцерна). Силос и концентраты животным этого вида допустимо использовать в небольших объёмах, только как подкормку.

Важно отметить, что эпизоотический процесс при некробактериозе возникает не в результате проникновения возбудителя инфекции от больных к здоровым животным, как это имеет место при классических инфекционных болезнях, а с предметов внешней среды через кожу, потерявшую естественную непроницаемость, в анаэробные условия подкожных тканей. Заболевают только те животные, у которых потеряны защитные функции.

---

Диагноз на некробактериоз устанавливают на основе выявления хромоты и характерного некротического поражения тканей нижней части конечностей. Чаще такое поражение отмечают на задних конечностях, поскольку их увлажнение способствует проникновению энтеральной микрофлоры в подкожные ткани через кожу, потерявшую непроницаемость. Признаками, предшествующими клиническому проявлению этой болезни, является болезненность суставов.

Для ранней диагностики некробактериоза и установления причин, порождающих эту болезнь, проводят вынужденный убой 2 – 3 животных и внимательно изучают состояние слизистой оболочки тонкого отдела кишечника и гиалиновой поверхности суставов нижней части конечностей. Желательно такой ветеринарный осмотр проводить во всех случаях очередной поставки скота для реализации на мясо.

Если причиной такой патологии был дефицит кальция в кормах, то его компенсируют обогащением рациона животных минеральными подкормками. К ним относятся мел, трикальцийфосфат, бикальцийфосфат и др. Надо отметить, что патология, порождённая дефицитом кальция в кормовом рационе, в современных условиях встречается сравнительно редко. Намного чаще дефицит кальция в сыворотке крови встречается в том случае нарушается процесс всасывания. Как уже было отмечено, это происходит при воспалении слизистой оболочки тонкого отдела кишечника. При этом нарушается и нормальное восприятие организмом животного гормонально активной формы витамина Д<sub>3</sub>.

Некротический очаг в подкожных тканях животного формируют те же микроорганизмы, которые в желудочно-кишечном тракте способствуют расщеплению и усвоению грубых кормов. Для этого им не требуется приобретать какие-то мифические эпизоотические свойства и повышенную вирулентность, как и при травматическом некробактериозе не требует повышения их патогенности.

Так как *Fuzarium necrophorum* является облигатным обитателем желудочно-кишечного тракта жвачных животных, этот микроб широко рассеян в местах содержания скота, и не надо в его популяциях искать штаммы с повышенной вирулентностью, патогенность его проявляется только при попадании в органы и ткани не свойственные для их естественной жизнедеятельности.

Инфекционный процесс и патогенез некробактериоза крупного рогатого скота изучены достаточно полно для того, чтобы конструировать средства специфической профилактики. Но усилия в этом направлении не дали желаемого эффекта. Еще на заре бактериологических исследований установлено, что против некробактериоза не удаётся получить выраженного иммунитета [9]. Широкомасштабная проверка нескольких вакцин убедительно подтвердила, что специфическая профилактика этой инфекционной болезни не эффективна [10]. Проанализировав патогенез болезни, ряд исследователей пришли к выводу что «не может быть никакой речи о вакцинации животных против некробактериоза» [1].

Однако работы по конструированию и использованию препаратов для профилактики некробактериоза крупного рогатого скота продолжают, но ситуация на современных животноводческих фермах показывает, что их использование не влияет на снижение заболеваемости некробактериозом.

Такая ситуация объясняется тем, что в процессе совместной эволюции микроорганизма (коэволюции) с крупным рогатым скотом у последнего сформировалась толерантность к данному микроорганизму, и хотя он продолжал характеризоваться признаками генетической чужеродности [11], но постоянное присутствие в желудочно-кишечном тракте крупного рогатого скота способности образовывать антитела к этому агенту, соответствующего по силе иммунного ответа адекватного по потенциальной силе болезнетворного воздействия. Хотя признаки генетической чужеродности

возбудителя инфекции всегда стимулировали выработку иммунобиологических реакций. Такие микроорганизмы не вызывают клинического проявления болезни до тех пор, пока резко не изменятся условия их жизнедеятельности. Для возбудителя некробактериоза эти условия меняются, когда он из желудочно-кишечного тракта попадает в анаэробные условия подкожных тканей или в другие органы своего хозяина.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Отечественные и зарубежные исследователи в результате длительного изучения некробактериоза пришли, в общем, к однозначным выводам: «решение проблемы целиком и полностью находится в ведении владельцев скота» [1], устранить факторы, порождающие некробактериоз «можно только совместными усилиями всех специалистов сельхозпредприятия, т.к. они связаны вопросами организации кормления, эксплуатации и содержания животных, являющимися общехозяйственными [2].

А эти мероприятия сводятся к своевременной заготовке, хранению и использованию в сухом состоянии обильной соломенной подстилки в рационе жвачных животных должно быть достаточное количество грубых кормов, не допускается злоупотребление концентрированными кормами и силосом, должна представляться животным достаточная площадь для отдыха и нормальной жизнедеятельности.

Таким образом, знание сущности эпизоотического процесса при некробактериозе крупного рогатого скота подтверждает, что защита факторных инфекционных болезней обеспечивается предупреждением проникновения возбудителей инфекции в ткани и органы не свойственные для их жизнедеятельности. Такая защита принципиально отличается от защиты с помощью специфических препаратов, которые успешно решают эту проблему при вспышках инфекционных болезней, возбудители которых проникают к животным извне.

### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Самоловов, А.А. Хромота – отражение системных метаболических болезней молочного рогатого скота/ А.А.Самоловов, С.В. Лопатин// «Инновации и продовольственная безопасность». – №2. – 2014. – С.76 – 80.
- 2 Хузин, Д.А. Пути оздоровления хозяйств от болезней пальцев, копытцев и некробактериоза/ Д.А. Хузин [и др.]// «Ветеринария сегодня». – 2013. – №4 (7). – С.22 – 27.
- 3 Джупина, С.И. Рациональная эпизоотологическая классификация инфекционных болезней с.-х. животных /С.И. Джупина//«Вестник Российской академ. с.-х. науки». – 2001. – №2. – С.71 –75
- 4 Самоловов, А.А. Некробактериоз крупного рогатого скота / А.А.Самоловов // Новосибирск.– 1998. – 139 с.
- 5 Лукьяновский, В.А. Биотехнологические закономерности возникновения ортопедических болезней у коров/ В.А. Лукьяновский// Ветеринария.– 1997.– № 10. – С. 35 – 41.
- 6 Беляков, В.Д., Каминский, Г.Д. Скрытые пружины эпидемий и профилактика будущего: гипотезы и прогнозы. Будущее науки. 21. 1988. – С.172 – 184.
- 7 Државецкая, И.А. Основы физиологии и обмена веществ и эндокринной системы/ И.А. Државецкая // М., «Высшая школа», 1983.
- 8 Розен, В.В. Основы эндокринологии/В.В. Розен// М., «Высшая школа».–1989.– С.305 – 308.
- 9 Коваленко, Я.Р. Некробациллёз. В кн.: Анаэробные инфекции сельскохозяйственных животных/ Я.Р. Коваленко// Госсельхозиздат, 1954.– С.167 – 217
- 10 Джупина, С.И. Причины заболеваемости и профилактика некробактериоза/ С.И.Джупина// «Ветеринария».– №7.–2005.– С.7 – 10.
- 11 Петров, Р.В. Иммунология/ Р.В.Петров// М., «Медицина», 1983.

Тяпша Ю.И., научный сотрудник  
Дубаневич О.В., младший научный сотрудник

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск

## ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ПОСТАНОВКИ ПЦР ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ГЕНОМА *Mycoplasma hyopneumoniae*

### Резюме

В статье описываются опыты по оптимизации параметров постановки ПЦР, сравнительный анализ эффективности выделения ДНК из легких и смывов верхних дыхательных путей и результаты изучения распространения *M. hyopneumoniae* в свиноводческих комплексах.

### Summary

The review about optimization of parameters PCR, the comparative analysis of efficiency of isolation of DNA from lungs and nasal swab and results distribution of *M. hyopneumoniae* are given in article

Поступила в редакцию 16.10.2014 г.

### ВВЕДЕНИЕ

В конце 80-х годов новый метод, полимеразная цепная реакция (ПЦР) открыл перспективы не только в молекулярной генетике, но и в клинической диагностике микоплазменных инфекций [3]. В основе этого метода лежит возможность избирательного многократного увеличения тех или иных последовательностей ДНК исследуемых образцов. Новый метод, оказавшийся достаточно быстрым по времени исполнения и высокочувствительным (уникальная последовательность ДНК может быть размножена до биллиона копий в течение 3 ч), стал претендовать на звание самого эффективного способа выявления микоплазм [2, 5].

По результатам исследования методом ПЦР в Европе установлено широкое распространение респираторного микоплазмоза, вызываемого *M. hyopneumoniae*. Инфицированность стад в Польше, Германии, Бельгии, Италии, Испании, Дании и Голландии в среднем составляет 68% [11].

В настоящее время описано множество методов ПЦР для выявления ДНК *M. hyopneumoniae* из различных типов образцов: классическая ПЦР с одной парой праймеров и электрофоретической

детекцией результатов [8], гнездовая ПЦР [7], мультиплексная ПЦР [9], ПЦР в реальном времени [10].

Использование гнездовой ПЦР с двумя парами праймеров приводит к значительному повышению чувствительности метода. Принцип этого варианта ПЦР основан на амплификации последовательностей с использованием двух пар праймеров. Первый этап реакции связан с амплификацией определенной последовательности с помощью "внешних" праймеров, а второй – с амплификацией последовательности, находящейся внутри амплифицированной (во время первого этапа) последовательности. В конечном счете подобный подход позволяет значительно увеличить чувствительность метода по сравнению с классическим вариантом ПЦР, а также идентифицировать вид микоплазм (если первая пара праймеров «универсальна», а вторая «специфична»). Чувствительность такого метода при условии идеальной пробоподготовки (выделение ДНК) соответствует приблизительно одной микоплазменной клетке в пробе [14]. Для сравнения стоит упомянуть, что при бактериологическом исследовании результаты культивирования микоплазм оказываются положительными

лишь при наличии в инокуляте не менее 100 – 1000 микоплазменных клеток [1, 6].

Мультиплексная ПЦР (мПЦР) позволяет в одной реакции выявлять и дифференцировать несколько видов микоплазм [1]. ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) имеет ряд преимуществ по сравнению с классическим вариантом ПЦР. Проведение реакции и регистрация результата осуществляется при ПЦР-РВ одновременно, что в значительной степени снижает риск контаминации образцов продуктами амплификации, а использование стандартов ДНК или РНК даже позволяет количественно охарактеризовать концентрацию возбудителя в исследуемой пробе [13].

Данные методы позволяют решать диагностические проблемы, связанные с клиническим анализом асимптоматичных форм болезни с иммунодепрессией, оценкой успешности антибиотикотерапии (в том числе при тестировании клеточных культур), выявлением некультивируемых (включая микоплазмоподобные организмы) микоплазм в любом биологическом материале [4].

При этом надо учитывать, что каждый метод имеет свои преимущества и недостатки, например, очень высокая чувствительность ПЦР (гнездовая) может привести к гипердиагностике. Поэтому очень чувствительные методы следует всегда сочетать с количественными методами диагностики. ПЦР метод не отражает напряженность иммунитета. Гнездовой метод более чувствителен, но и более трудоемок в исполнении, увеличивается риск контаминации, количественный метод ПЦР обладает высокой чувствительностью и менее трудоемок, но данный метод требует более дорогого обслуживающего оборудования и расходных материалов. Выбор конкретной разновидности метода проводимого исследования является одним из важнейших этапов любой научной работы. Практическое применение этих методов требует особо тщательной постановки реакции с учетом возможной контаминации клинического материала, носительства или персистенции возбудителя [15].

Основанием для разработки набора реагентов для диагностики микоплазмоза в ПЦР явилась высокая чувствительность метода. В РФ отсутствуют ПЦР тест системы для детекции ДНК *M. hyopneumoniae*. Метод пригоден для прижизненного (спатум, ларинго-трахеальные смывы) и посмертного (легкие) исследования животных всех возрастных групп. Это выгодно отличает ПЦР от ИФА, результаты которого в большей степени зависят от времени инфицирования и возраста животных [12].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы следующие реактивы: 10x PCR буфер для Tag ДНК-полимеразы (ГНУ «Институт биоорганической химии НАНБ»), 10x ТАЕ-буфер pH 8,0 (SIGMA), маркер молекулярного веса «GeneRuler 50 bp Ladder» (Fermentas, Литва), термостабильная ДНК-полимераза (Таq-полимераза, 5 ед/мкл) (ГНУ «Институт биоорганической химии НАНБ»), раствор MgCl<sub>2</sub> (50 мМ), смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (25 мМ) (Fermentas, Литва), праймеры для определения принадлежности к *Mycoplasma hyopneumoniae*, агароза (helicon, Россия).

Наработку ПЦР продукта проводили на амплификаторе «Thermal cycler C1000 Bio-rad» (США). Полученные образцы визуализировали путем электрофореза «Consort» (Бельгия) в геле с бромистым этидием, учитывали результаты с помощью прибора Gel Doc XR и программы imageLab Software, BIO-RAD (США). Выделение ДНК проводили кипячением в течение 10 минут в лизирующем буфере, ЭДТА-трис HCl буфере с pH – 8,0 выделением ДНК на миниколонках с использованием хаотропных агентов, различных буферов для отмывки и получения ДНК без ингибиторов, реакции, выделение ДНК соосаждением, используя многокомпонентный лизирующий, преципитирующий и отмывочный растворы. Положительный контроль, ДНК *M. hyopneumoniae* консервировали эуксидом 1:1000 и 1:10000, формалином 0,5%,

этанолом 70% и замораживанием при температуре 20 °С. ПЦР провели через 6 месяцев.

Температуры плавления праймеров комплементарных высококонсервативным участкам гена *M. hyorhneumoniae*, которые фланкировали фрагмент 459 bp рассчитывали по формуле ( $T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$ ).

5 минут предварительная денатурация при 95 °С

30 сек денатурации при 94 °С

60 секунд отжига праймеров при 60 °С

60 секунд элонгации при 72 °С

7 минут заключительной элонгации при 72 °С

30, 35, 40, 45, 50 циклов амплификации

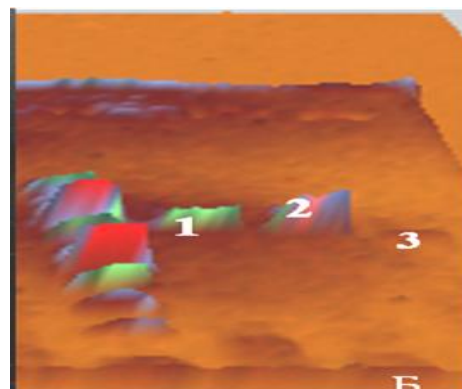
Для определения чувствительности тест-системы ПЦР при детекции специфического участка ДНК у *M. hyorhneumoniae* мы исследовали десятикратные разведения суспензии *M. hyorhneumoniae*, конечная концентрация микробных клеток в эксперименте составила соответственно  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  (определение концентрации клеток микоплазм проводили на основании ГОСТ Р 51758–2001 п.4.1.1.3. и 4.1.1.5 путем серии последовательных разведений бульонной культуры *M. hyorhneumoniae* и посевом на твердые питательные среды с последующим вычислением КОЕ в 1 см<sup>3</sup>. Для изучения эффективности выделения ДНК *M. hyorhneumoniae* в качестве исследуемого материала у свиней, использовали легкие с классическими патологоанатомическими изменениями, характерными для микоплазмоза, и смывы из верхних дыха-

тельных путей.

Расчет экономического эффекта от использования тест-систем ИФА и ПЦР проводили согласно учебно-методическому пособию «Определение экономической эффективности мероприятий в ветеринарной медицине», утвержденному ГУВ и ГПИМСХ и ПРБ от 12 мая 2009г, №10-1-5/802.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На рисунке 1 представлены результаты амплификации ДНК *M. hyorhneumoniae*, выделенной разными способами. Наиболее выраженная полоса 459 bp была получена с ДНК, очищенной на миниколонке и соосаждением. На рисунке 1 (Б) в формате 3D видно, что наиболее эффективное выделение ДНК на миниколонках.

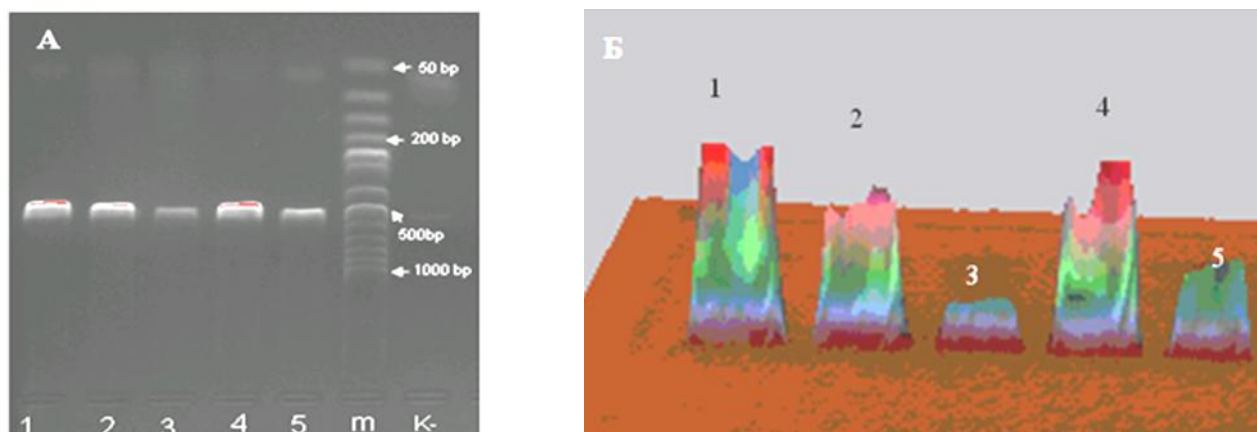


Примечание – А – 2D формат, Б – 3 D формат

**Рисунок 1 – Электрофорез ампликонов ДНК *M. hyorhneumoniae*. Выделение ДНК: 1 – соосаждением; 2 – на миниколонках; 3 – кипячением в лизирующем буфере**

Лучшие результаты консервации положительного контроля (ДНК *M. hyorhynchus*) получены при консер-

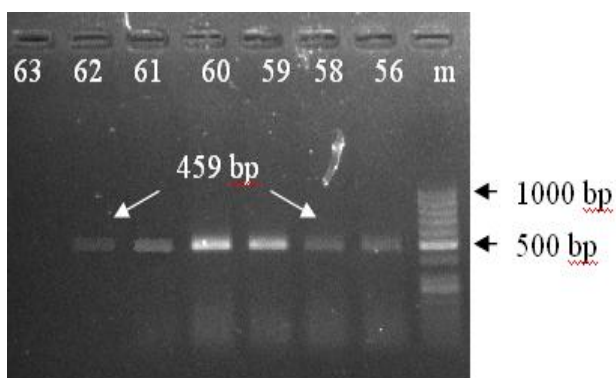
вировании материала эуксиллом и этанолом, что было подтверждено при анализе результатов в 3D формате (рисунок 2 Б).



**Рисунок 2 – Электрофорез ампликонов ДНК *M. hyorhynchus* после 6 месяцев консервации: 1 – эуксилл 1:10000; 2 – эуксилл 1:1000; 3 – 0,5% формалином; 4 – 70% этанол; 5 – замораживание при -20°C**

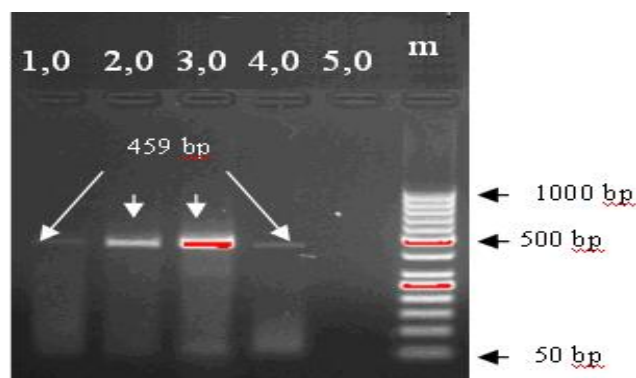
Учитывая, что температура плавления прямого и обратного праймеров не совпадали (60 и 64° С соответственно), провели исследование по выбору оптимальной температуры их отжига, которая была в диапазоне 56 – 63°С.

На рисунке 3 представлены результаты электрофореза полученных ампликонов. Наиболее интенсивная и четкая полоса образовывалась при температуре отжига 60°С.



**Рисунок 3 – Электрофорез ампликонов, полученных при отжиге при температуре 56 – 63°С**

Поскольку ДНК-полимераза является магнийзависимым ферментом и концентрация ионов магния влияет на активность фермента, высокая концентрация ведет к ингибированию реакции. Оптимум в зависимости от активности полимеразы находится в области 0,5 – 5 мМ. Поэтому в опы-



**Рисунок 4 – Электрофорез ампликонов. Влияние MgCl<sub>2</sub> на количество ПЦР продукта при амплификации**

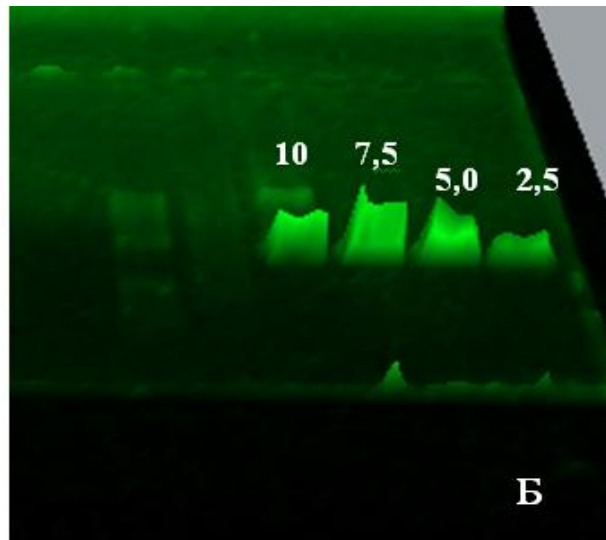
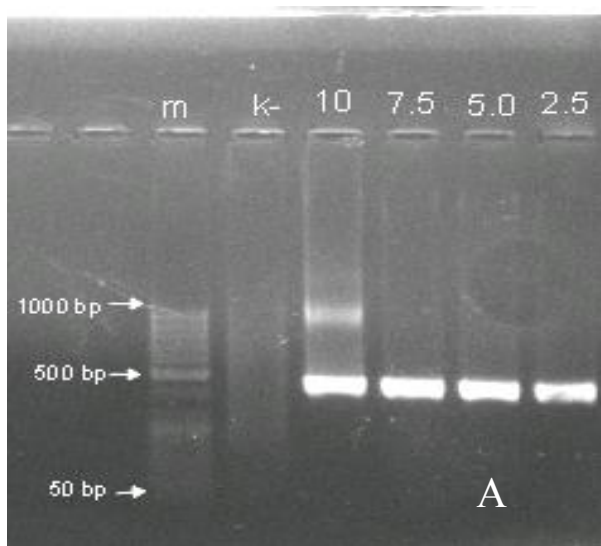
те мы определяли концентрации MgCl<sub>2</sub> в реакционной смеси 1; 2; 3; 4; 5 мМ.

На рисунке 4 видно, что оптимальная концентрация в реакционной смеси MgCl<sub>2</sub> составляет 3 мМ, при этом образовывалась наиболее интенсивная и четкая специфическая полоса на уровне 459 bp.

При использовании более высоких концентраций – 5 mM происходило полное ингибирование реакции (рисунок 4).

Количество полимеразы также влияет на протекание ПЦР. В исследованиях использован препарат ферментный – смесь термостабильных ДНК-полимераз TP-mix polymerases, серия № 067-01, ТУ ВУ 100185093.067-201, УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси».

При исследовании влияния концентраций 2,5, 5,0, 7,5, 10 ед. ДНК-полимеразы на протекание реакции в 50 мкл реакционной смеси установлено, что оптимальный синтез ампликонов отмечался при концентрации 5 ед. и 7,5 ед. Снижение дозы приводило к уменьшению синтеза конечного продукта. Избыток полимеразы в 2 – 4 раза приводит к появлению диффузных фракций.



**Рисунок 5 – Электрофорез ампликонов. Влияние Taq - полимеразы (ЕД/мкл) на количество ПЦР продукта при амплификации**

На следующем этапе были подобраны оптимальные условия амплификации, при которых нарабатывается такое количество продукта, которое можно обнаружить в геле, окрашенном бромистым этидием.

Известно, что 2 нг ДНК фрагментов при ширине полосы в геле 0,5 см достаточно, чтобы определить их визуально. В опыте мы использовали следующие режимы амплификации:

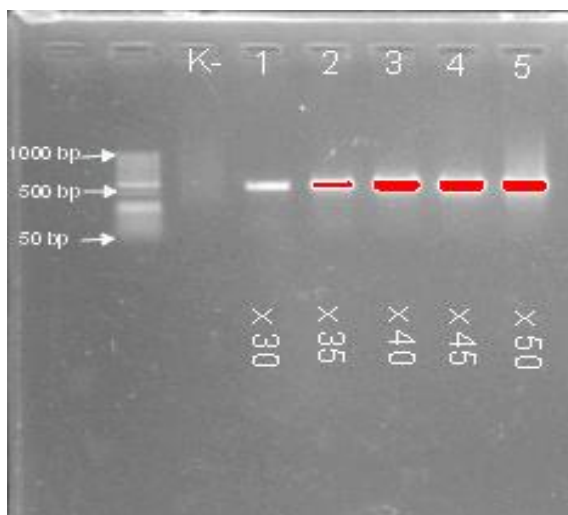
- 5 минут предварительная денатурация при 95°C
  - 30 секунд денатурации при 94°C
  - 60 секунд отжига праймеров при 60°C
  - 60 секунд элонгации при 72°C
  - 7 минут заключительной элонгации при 72°C
- } 30, 35, 40, 45, 50 циклов амплификации

На рисунке 6 видно, что оптимальное количество циклов было в пределах 40 – 45. При увеличении числа циклов до 50 образовывался неспецифический шлейф, а количество ПЦР продукта не увеличивалось.

Для определения чувствительности ПЦР тест-системы мы использовали биомассу *M. hyor pneumoniae*, полученную на

двухсоставной питательной среде (ДС), состоящей из твердой фазы в виде агара для прикрепления клеток микоплазм и жидкой части – в виде среды АТСС. На 10-й день культивирования концентрация клеток в суспензии составила  $1,64 \times 10^9$  КОЕ/см<sup>3</sup>, которую затем довели до миллиардной концентрации физраствором.

В эксперименте выделение ДНК проводили из суспензий с концентрацией  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  клеток. Учитывая, что для выделения ДНК использовали 100 мкл культуры, элюирование ДНК проводили в 100 мкл и для исследования в ПЦР использовали 1 мкл образца каждого разведения,

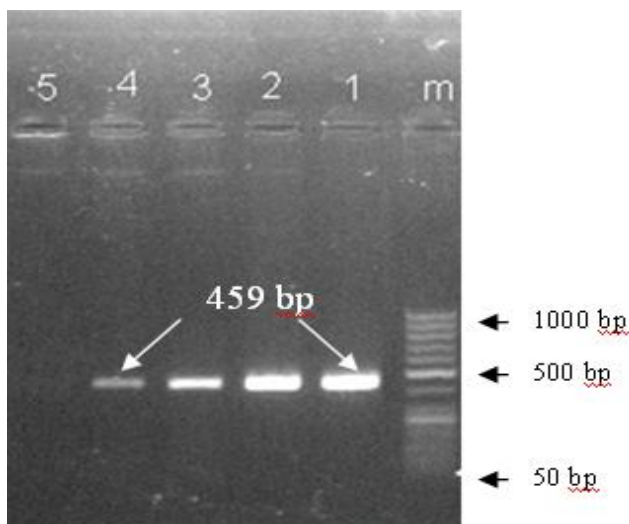


**Рисунок 6 – Электрофорез ампликонов. Зависимость количества полученного продукта от количества циклов амплификации**

На следующем этапе сравнили эффективность выделения ДНК *M. hyorhynchus* из легких и смывов верхних дыхательных путей. В убойном цехе мясокомбината отбирали легкие с классическими изменениями, характерными для микоплазмоза, и брали смывы из верхних дыхательных путей.

то конечная концентрация микробных клеток в эксперименте составила соответственно  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  клеток.

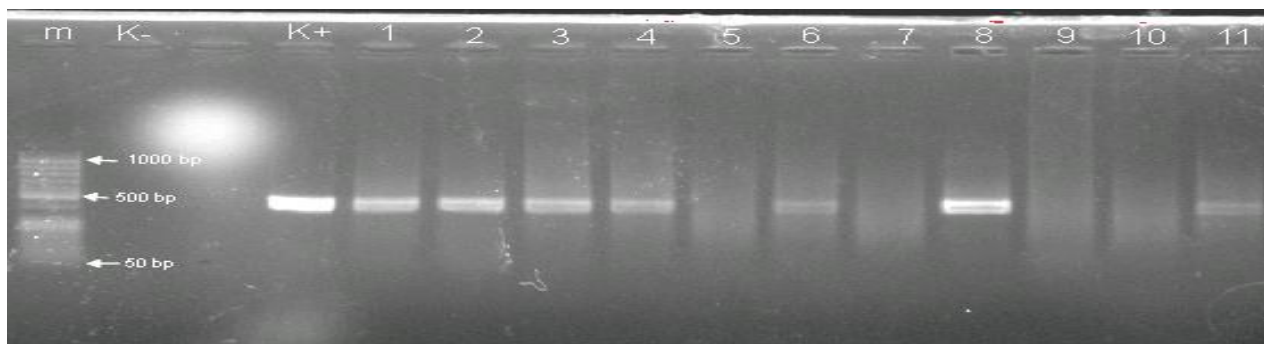
На рисунке 7 видно, что минимальная концентрация клеток *M. hyorhynchus*, обнаруживаемая в ПЦР, составляет 100 клеток.



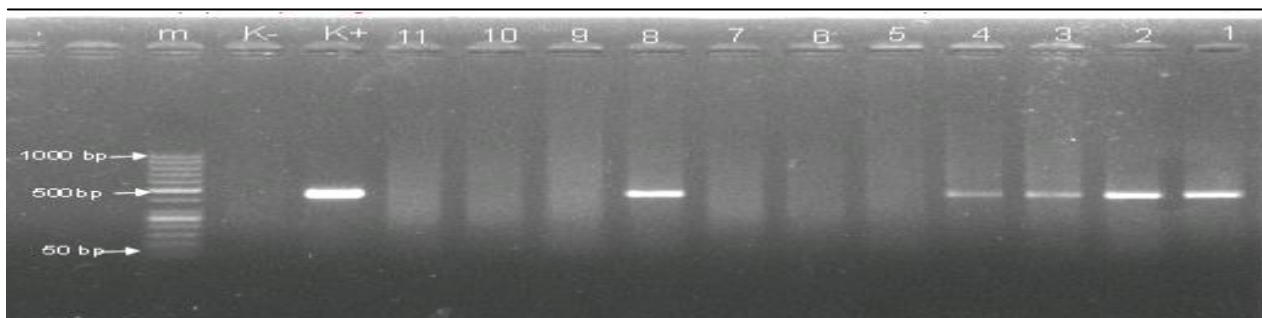
**Рисунок 7 – Электрофорез ампликонов. Количество микробных клеток детектируемых в ПЦР. 1 –  $10^5$  микробных клеток, 2 –  $10^4$  микробных клеток, 3 –  $10^3$  микробных клеток, 4 –  $10^2$  микробных клеток, 5 –  $10^1$  микробных клеток**

Исследовано по 11 образцов легких, отобранных на границе здоровой и воспаленной ткани, и 11 смывов верхних дыхательных путей. На рисунке 8 видно, что положительную реакцию дали 7 образцов из 11 (63,6%).

При исследовании в ПЦР смывов (рисунок 9) положительный результат был получен в 5 случаях (45,5%).



**Рисунок 8 – Электрофорез ампликонов, полученных при выделении ДНК из легких**



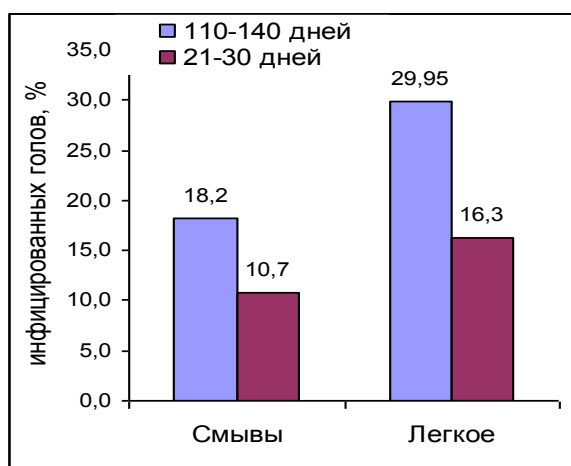
**Рисунок 9 – Электрофорез ампликонов, полученных при выделении ДНК из смывов верхних дыхательных путей**

Таким образом, полученные результаты указывают на большую целесообразность исследования непосредственно пораженных тканей легких (результативность выше на 18,1%). Тем не менее, для прижизненной диагностики можно отбирать смывы с верхних дыхательных путей.

При комплексных исследованиях с применением разработанной ПЦР тест-системы микоплазменная инфекция встречалась в 20 из 24 (83,3%) обследованных свиноводческих комплексах. В ПЦР ДНК *M. hyopneumoniae* находили в 6,8 – 28,8%

случаев из смывов верхних дыхательных путей и в 8,3 – 40% случаев из легких.

Необходимо отметить, что положительный результат получен чаще из патологического материала свиней группы откорма (110 – 140 дней). На рисунке 10 видно, ДНК *M. hyopneumoniae* детектировалась у свиней группы откорма в смывах в 18,2% случаев, в легких – 29,95%, а у поросят 21 – 30 дневного возраста в 10,7% и 16,3% случаев соответственно, что в 1,7 – 1,8 раз реже, чем в группе откорма.



**Рисунок 10 – Результаты исследования в ПЦР легких и смывов из верхних дыхательных путей свиней разных возрастных групп на наличие ДНК *M. hyopneumoniae***

Полученные результаты свидетельствуют о широком распространении микоплазменной инфекции и целесообразности проведения мониторинговых исследований разработанной тест-системой, т.к. она в 2 – 4 раза дешевле зарубежных аналогов (ООО ИнтерЛабСервис, VetMAX™, Genekam). Экономическая эффективность разработанной тест-системы для обнаружения генома *M. hyopneumoniae* составила 4,9 рублей на 1 рубль затрат.

## ВЫВОДЫ

1 При разработке ПЦР тест-системы для выявления инфицированности свиней *M. hyopneumoniae* определены оптимальные параметры постановки реакции:

концентрация  $MgCl_2$  – 3мМ;

концентрации ДНК-полимеразы – 5,0–7,5 единиц;

протокол амплификации:

5 мин – 95°C  
30 сек – 94°C  
60 сек – 60°C  
60 сек – 72°C  
7 мин – 72°C

} 40 циклов

2 Оптимизация параметров постановки ПЦР обеспечивала чувствительность тест-системы в одной пробе – 10<sup>2</sup> клеток *M. hyopneumoniae*.

3 Выявление ДНК *M. hyopneumoniae* при исследовании легких с патологоанатомическими изменениями составило 63,6%,

смывов верхних дыхательных путей – 45,5%.

4 Эуксил (1:10000) и 70% этанол являются лучшими консервантами ДНК, обеспечивающими его хранение в течение 6 месяцев при температуре 4°C.

5 При мониторинговом исследовании с использованием ПЦР установлено, что инфицированность свиноводческих комплексов *M. hyopneumoniae* составляет 83,3 %, заболеваемость свиней – 6,8 – 40 %.

6 ДНК *M. hyopneumoniae* детектировалась у свиней группы откорма в 1,7 – 1,8 раз чаще, чем у поросят 21 – 30-дневного возраста.

## ЛИТЕРАТУРА

- 1 Бирюченкова, М.В. Разработка методов диагностики инфекции, вызываемой *Mycoplasma hyopneumoniae* : автореф. дис. канд. биол. наук : 03.01.06 / М.В. Бирюченкова; [Гос. науч. учреждение “Всерос. науч.-исслед. ин-т ветеринар. вирусологии и микробиологии” Россельхозакадемии]. – Покров, 2011. – 31 с.
- 2 Гончаренко, Г.Г. Основы генетической инженерии: учеб.пособие / Г.Г. Гончаренко. – Минск: Выш. шк., 2005. – 183 с.
- 3 Использование метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики инфекционных заболеваний : учеб.-метод. пособие / В.И. Дорофеев [и др.]; Ставроп. гос. аграр. ун-т.–Ставрополь, 2008.–45 с.
- 4 Микоплазменная инфекция у свиней / Л.И. Ефанова [и др.] // Достижения науки и техники АПК. – 2012. – № 1. – С. 35–36.
- 5 Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности: МУ 1.3.1888-04: утв. и введ. 04.03.2004. – М., 2004. – 11 с.
- 6 Ahrens, P. Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* with a DNA probe / P. Ahrens, N.F. Friis // Letters in Appl. Microbiology. – 1994. – Vol. 12, № 6. – P. 249–253.
- 7 A mycoplasma genetic element resembling prokaryotic insertion sequences / R.V. Ferrell [et al.] // Molecular Microbiology. – 1989. – Vol. 3, № 7. – P. 957–967.
- 8 Artiushin, S., Development of polymerase chain reaction primers to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* / S. Artiushin, L. Stipkovits, F.C. Minion // Molecular and Cellular Probes. – 1993. – Vol. 7, № 5. – P. 381–385.
- 9 Characterization of the *Mycoplasma* genome / S. Razin [et al.] // J. of Biology and Medicine. – 1983. – Vol. 56, № 5–6. – P. 357–366.
- 10 Diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig farms revealed by direct molecular typing of clinical material / D. Mayor [et al.] // Veterinary Research. – 2007. – Vol. 38, № 3. – P. 391–398.
- 11 Dohring, S. Feldstudie zum Einfluss einzeltierspezifischer Risikofaktoren für die Infektion mit *Mycoplasma hyopneumoniae* bei Saugferkeln in Norddeutschland : inaug. diss. Dr. der Veterinärmedizin / S. Dohring. – Hannover, 2012. – 203 p.
- 12 Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets / C. Marois [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2007. – Vol. 120, № 1–2. – P. 96–104.
- 13 Quantification of the spread of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nursery pigs using transmission experiments / T. Meyns [et al.] // Preventive Veterinary Medicine. – 2004. – Vol. 66, № 1–4. – P. 265–275.
- 14 Sensitive detection of mycoplasmas in cell cultures by using two-step polymerase chain reaction / R. Harasawa [et al.] // Rapid Diagnosis of Mycoplasmas / ed. I. Kahane, A. Adoni. – New York, 1993. – P. 227–232.
- 15 Use of a *Mycoplasma hyopneumoniae* nested polymerase chain reaction test to determine optimal sampling sites in swine / K.T. Kurth [et al.] // J. of Veterinary Diagnostic Investigation. – 2002. – Vol. 14, № 6. – P. 463–469.

## ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОПАРАЗИТОЦЕНОЗОВ В КИШЕЧНИКЕ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ APIS MELIFERA L. ПРИ НОЗЕМАТОЗНОМ ПРОЦЕССЕ

### Резюме

В микробиоценозе гнезда здоровых пчелиных семей преобладающее количество видов бактерий представлено микроорганизмами преимущественно с эпифитными свойствами, которые выделяются главным образом из кишечника пчел и их расплода старше 3-дневного возраста, а также из пыльцы, перги. В пчелином гнезде встречаются грибы из рода *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma*; дрожжи из рода *Torulopsis*, *Candida*, *Saccharomyces*.

При нозематозной инвазии бактериальная флора гнезда пчел представлена в основном 5-ю семействами: *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Pseudomonaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Coccaceae*. Из числа бактерий преобладают неспоровые палочкообразные формы. Спорообразующие формы микроорганизмов в большинстве своем представлены почвенными бациллами. При нозематозном процессе отмечено значительное увеличение микрофлоры, в том числе патогенных: *E. coli*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*

### Summary

In microbiocenosis of habitation healthy bee colonies the prevalent number bacterial species are represented by microorganisms predominantly with epiphytic properties, which are distinguished mainly from the intestines of bees and their brood over 3 days of age, as well as pollen, ambrosia. In the bee habitation occur fungi of the genus *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma*; yeast of the genus *Torulopsis*, *Candida*, *Saccharomyces*.

When nozematoznoy invasion, bacterial flora habitation of bees are represented mainly by 5 families: *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Pseudomonaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Coccaceae*. Among the microorganisms are predominant *Nesporova rod-shaped forms*. Spore forms of microorganisms are mostly represented by soil bacilli.

When nozematoznom process is showed a significant increase of microflora, including toxigenic bacteria as so as pathogenic: *E. coli*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*

Поступила в редакцию 03.11.2014 г.

### ВВЕДЕНИЕ

Количественный и видовой состав микрофлоры гнезда пчел тесно связан со средой их обитания. В поисках медоносов и источников воды пчелы контактируют с различными микроорганизмами. Нормальная микрофлора гнезда пчел связана с микроорганизмами, занесенными в улей с нектаром, падею, водой и пыльцой. Эволюционно связанная с организмом хозяина, она представлена микроорганизмами преимущественно с эпифитными свойствами. Микробиоценоз оказывает существенное, а в ряде случаев и решающее влияние на все стороны жизнедеятельности пчел через модуляцию различных биохимических реакций и физиологических функций организма. Взаимоотношение организма пчелы и микрофлоры при нормальном физиологиче-

ском состоянии носит симбиотический характер, при котором микрофлора выполняет ряд положительных функций: продуцирует ферменты, участвующие в метаболизме нуклеиновых кислот, белков, углеводов, липидов; участвует в синтезе биологически активных соединений – витаминов, антибиотиков, обеспечивая иммунную устойчивость организма насекомых. В то же время сдвиг микрофлоры в сторону условно-патогенных или патогенных представителей, а также транслокация их и образуемых ими токсинов через стенку кишечника сопровождаются возникновением эндогенной инфекции различной локализации [5].

Несмотря на способность некоторых патогенов проникать через кутикулу насекомых механически и энзиматически, все же основным путем проникновения

---

микробных агентов в природных условиях у медоносной пчелы является желудочно-кишечный тракт. Контаминация пчел условно-патогенной и патогенной микрофлорой оказывает повреждающее влияние на кишечный эпителий, снижая резистентность организма и вызывая повышенное поступление во внутреннюю среду гемоцель – спор, бактерий, грибов, токсинов [4].

Основным органом пчел, который поражается возбудителем нозематоза – микроспоридией *Nosema apis* Z. – является средняя кишка. С внутренней стороны средняя кишка пчел не покрыта хитином, но имеет перитрофическую мембрану (оболочку), предохраняющую клетки кишки. По сведениям ряда исследователей уже после двух-трех часов после попадания спор ноземы в кишечник пчелы обнаружена адгезия и проникновение единичных спор *Nosema apis* Z. на поверхность слизистой средней кишки [6,7]. Чем плотнее оболочка, тем труднее возбудителю нозематоза проникнуть сквозь нее и добраться до клеток. Наибольшая плотность перитрофической мембраны наблюдается у молодых пчел от 4<sup>x</sup> до 12-тидневного возраста, поэтому они более устойчивы к заболеванию. У старых, а также истощенных зимовкой насекомых защитная мембрана становится рыхлой и более подверженной проникновению сквозь нее патогена.

По данным проведенных нами исследований заражению более подвержены пчелы старше 20-дневного возраста. После проникновения патогена в организм пчел происходит процесс поражения возбудителем эпителиальных клеток слизистой оболочки кишечника насекомых и интенсивное развитие паразита. Патологический процесс с отдельных участков постепенно распространяется на весь кишечный отдел. В качестве защитной реакции со стороны организма пчелы идет отторжение пораженных ноземой эпителиальных клеток, а процесс образования перитрофической мембраны прекращается. Заполненные спорами оболочки клеток выходят в просвет кишечника, разрываются – происходит реинвазия здоровых

участков эпителия и рассеивание спор с калом во внешней среде. Защитные функции средней кишки ослабевают, что дает возможность легко заразиться другим эпителиальным клеткам. Использование российскими исследователями сканирующей электронной микроскопии при изучении нозематозного процесса в организме пчел показало, что цикл развития паразита – от начала заражения до появления молодых спор ноземы – составляет 72 ч при температуре 30<sup>0</sup>C [6]. Ферментативная деятельность пораженных эпителиальных клеток понижается, а перистальтика средней кишки увеличивается. Массовое развитие ноземы вызывает увеличение средней кишки, изменение цвета, потерю ею сегментации. Задняя кишка быстрее наполняется экскрементами, что вызывает опоношенность во время зимовки пчел. Единичные больные пчелы способны заразить большинство здоровых и привести к массовой гибели пчел.

По мнению ряда исследователей, в развитии патологических изменений при нозематозе пчел значительную роль играет микрофлора кишечника, в частности, выделяемые микроорганизмами токсины [3]. Известно также, что поражение пчел микроспоридиями сопровождается септициемией, что обычно приводит к гибели насекомых. В литературных источниках ряд авторов указывает, что развитие нозематозного процесса у пчел приводит не только к гипотонии или полной атонии средней кишки, но и сопровождается накоплением в ней продуктов распада и увеличением условно патогенной и патогенной микрофлоры [2,3]. Однако в литературе до сих пор не достаточно освещен вопрос о количественном и качественном составе микрофлоры кишечника пчел, инвазированных *Nosema apis* Z.

Учитывая, что в кишечнике пчел в процессе жизнедеятельности возникают разнообразные сообщества микроорганизмов, а при инвазионном процессе формируется микропаразитоценоз, в задачу наших исследований входило изучение микрофлоры пчелиной семьи в норме и при нозематозной инвазии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась в пчеловодческих хозяйствах Минского и Червенского районов Минской области, а также на экспериментальной пасеке института. В качестве объектов исследования использован материал, отобранный от 15 здоровых и 15 инвазированных возбудителем нозематоза *Nozema apis* Z. пчелосемей. В процессе работы использованы пробы летных рабочих пчел – 2050, личинок до 3-хдневного возраста – 75, личинок от 3-хдневного возраста до момента запечатывания – 110, запечатанных личинок – 150, молодых, только вышедших из расплода пчел – 80, внутриульевых пчел (до 17–20-дневного возраста) – 120. Кроме того, исследовано 15 проб пыльцы, 25 – перги, 30 – прополиса, проведено 100 соскобов и смывов с различных частей ульев.

Для изучения микрофлоры пчелиного гнезда были использованы элективные среды, приготовленные по А.А. Барскову, картофельный и мясо-пептонный агары и бульоны с добавлением 2% глюкозы, среда Эндо, Перетца, бульон Штерна. *Melissococcus pluton* культивировали на среде Бейли, а также на среде Томашеца.

Протеолитические свойства некоторых бактерий, не культивируемых на мясо-пептонной желатине, изучали на соответствующей элективной среде с добавлением 10–12% желатины; сахаролитические – на тех же средах, заменяя глюкозу соответствующими углеводами.

При идентификации паратифозных бактерий использовали агглютинирующие сыворотки.

Окраску кристаллов у кристаллообразующих бацилл проводили по методу Швецовой, 1962. Изучение гидролиза крахмала, реакцию с метил-красным и реакцию на ацетил-метилкарбинол у неспоровых бактерий проводили по В.П. Израильскому, 1960. Реакцию на ацетил-метилкарбинол у спорообразующих бактерий, а также рост бактерий с нитратами и на средах с молоком проводили по Лорду, 1960.

Исследования проводили в соответ-

ствии со схемами идентификации, представленными в определителе бактерий Берджи, 1997.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данные по микробиологическому обследованию пчелиных семей, инвазированных ноземами, и группы здоровых семей отображены в таблице 1. Для контрольной группы пчел были характерны следующие особенности микробного пейзажа. Микрофлора, выделенная из здорового пчелиного гнезда, взрослых пчел, расплода, пыльцы, перги, нектара, меда, прополиса, соскобов и смывов различных частей ульев, отнесена нами к 5 основным семействам: *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Pseudomonaceae*, *Coccaceae*.

В микробиоценозе пчелиного гнезда, особенно той его части, которая представлена бактериями, преобладают неспоровые палочковидные формы. Спорообразующие формы микроорганизмов представлены в основном почвенными бациллами.

В пчелином гнезде встречаются грибы из рода *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Pericystis*, *Trihoderma*; дрожжи из рода *Candida*, *Klopera*, *Saccharomyces Torulopsis*, *Zygosaccharomyces*.

Кишечник личинок пчел до 3-дневного возраста имеет незначительное количество микроорганизмов, которые выделяются непостоянно и являются представителями случайной микрофлоры. Микрофлора личинок старше 3-хдневного возраста, в основном, представлена неспоровыми бактериями (до 5,8%). Кроме этого, выделяются спорообразующие бактерии (от 1 до 10%). Кишечник куколок практически стерилен.

Исследования показали, что кишечник новорожденных пчел практически стерилен и только начиная с 4 – 5-дневного возраста начинает заселяться облигатной микрофлорой рода *Lactobacterium*. Совершенно иную картину наблюдали у пчел, покидающих улей и начинающих летать за взятком. В 1г содержимого кишечника пчел – сборщиц нектара, пыльцы и воды – наряду с *Lactobacillus plantarum*, составлявшей 8,9%,

и аэробными спорообразующими микроорганизмами *Bac.subtilis*, *Bac.cereus* и *Bac.mesentericus*, составлявшими 8,7%, в значительном количестве (31,3%) присутствовали энтерококки: *Str.faecalis*, *Str.faecium*, *Str.durans* и промежуточные между *Str.faecalis* и *Str.faecium* формы. Доминирующее положение в кишечнике здоровых летных пчел (51,1%) занимали энтеробактерии. Их спектр состоял из 11 видов – представителей 8 родов семейства *Enterobacteriaceae*: *Ervinia herbicola*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter amalonaticus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Hafnia alvei*. Выявленная нами картина микробного пейзажа кишечника пчел классифицирована как случайная бактериальная флора, зависящая от контакта пчел-сборщиц с природными субстратами и, прежде всего, с медоносными растениями [5].

Бактериальная флора пыльцы и свежей перги преимущественно состоит из микроорганизмов рода *Lactobacterium*, а также 10 родов семейства *Enterobacteriaceae*: *Escherichia*, *Proteus*, *Providencia*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Citrobacter*, *Erwinia*, *Serratia*, *Morganella*, *Klebsiella*. Представители микробиоценоза пыльцы и перги из родов *Lactobacterium* и *Escherichia* имеют большое значение при консервировании перги для улучшения ее перевариваемости организмом насекомых и предохранения от порчи.

Установлено, что микроорганизмы не адаптируются в медовом зобике пчел. Микрофлора незапечатанного меда чрезвычайно бедна в количественном отношении и не носит постоянного характера. Запечатанный мед не содержит бактерий, а только дрожжевую и грибковую флору. Кислотность, осмотическое давление, продуцирование и накопление перекиси водорода ответственны за такой эффект нектара и меда. Мед, как любая гиперосмотическая среда, обладает способностью уничтожать многие живые клетки, кроме осмофильных бактерий и грибов. Указанным свойством

объясняется антимикробная активность нектара и меда – одного из важных защитных факторов гнезда пчел, который задерживает рост и развитие многих сапрофитных бактерий и грибов [4].

Из свежего прополиса, являющегося сложной смесью восков, смол, бальзамов, масел и небольшого количества пыльцы, микроорганизмы, как правило, не выделялись. С поверхности прополиса, длительное время (более 2-х лет) сохранявшегося в семьях, выделялись *Bac.subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Bac. pseudoanhracis* и в единичных случаях *Nozema apis*, *Proteus vulgaris* и *Sarcina flavus*.

Состав микрофлоры, имеющейся на вновь отстроенных сотах, холстиках, стенках и соре улья, довольно беден и непостоянен.

В кишечнике летных и ульевых пчел, инвазированных *Nozema apis*, в отличие от микрофлоры кишечника здоровых семей, доминирующее положение занимают кокковые формы (58,9%). Из выделенных 4-х видов стафилококков: *Staph.aureus*, *Staph. saprophyticus*, *Staph. muscae*, *Staph. epidermidis*, 3 вида – *Staph. aureus*, *Staph. muscae* и *Staph. epidermidis* – были патогенными для мышей. Патогенными для мышей были изолированные от инвазированных ноземой пчел стрептококки: *Str. epidermidis*, *Str. apis*, *Str. disparis*. Из выделенных от больных нозематозом насекомых аэробных бацилл рода *Bacillus* (29,1%) виды: *Bac. mesentericum*, *Bac. megaterium* и *Bac. alvei* вызывали гибель белых мышей. Гибель белых мышей вызывала изолированная из кишечника пчел, инвазированных *Nozema apis*, *Bact. apisepticum*. Из энтеробактерий (94,7%) преобладают условно патогенные для пчел бактерии родов *Ervinia*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia*. Кроме того, *E. coli* серогруппы O8 и O15 вызывала гибель белых мышей. Патогенные микроорганизмы в кишечнике инвазированных *Nozema apis* насекомых были выявлены в 87% случаев от числа исследованных пчел.

Таким образом, качественный состав микрофлоры кишечника пчел, инвазированных *Nozema apis*, существенно отличается от такового у насекомых, свободных

от возбудителя нозематоза. Кроме того, увеличивается число патогенных микроорганизмов, которые здесь становятся доминирующими.

Таблица 1 – Особенности микрофлоры гнезда здоровых и пораженных нозематозом пчел

Виды микроорганизмов	Выделены от здоровых пчелосемей, %	Выделены от больных нозематозом семей, %
<i>Bacillus megaterium</i>		11,5
<i>Bac. subtilis</i>	5,7	8,3
<i>Bac. mesenthricus</i>	1,1	7,0
<i>Bac. cereus</i>	1,9	2,3
<i>Staphylococcus aureus</i>		3,1
<i>Staph. epidermicus</i>		4,3
<i>Staph. saprophyticus</i>		7,5
<i>Staph. muscae</i>		4,7
<i>Streptococcus faecalis</i>	16,1	9,2
<i>Str. epidermicus</i>		4,1
<i>Str. durans</i>	10,0	9,0
<i>Str. faecium</i>	5,2	7,5
<i>Str. apis</i>		4,5
<i>Str. disparis</i>		5,0
<i>Lactobacterim plantarum</i>	8,9	
<i>Ervinia herbicola</i>	23,4	17,0
<i>Hafnia alvei</i>	2,5	
<i>Citrobacter freund</i>	1,7	11,4
<i>Citr. amalonaticus</i>	1,4	9,0
<i>Escherichia coli</i>	0,9	14,7
<i>Enterobacter cloacae</i>	2,0	3,7
<i>Proteus vulgaris</i>	3,3	1,9
<i>Proteus mirabilis</i>	9,0	5,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,1	13,0
<i>Klebsiella oxitoca</i>	0,8	1,0
<i>Serratia marcescens</i>	3,0	8,8
<i>Morganella morgani</i>		7,3
<i>Bacterium apisepticum</i>		4,1
<i>Providencia retgeri</i>		1,9
<i>Pseudomonas herbicola</i>		11,3

По результатам проведенных нами исследований установлено, что качественный состав микрофлоры кишечника пчел *Apis mellifera L.*, инвазированных *N.apis*, существенно отличается от такового у насекомых, свободных от возбудителя нозематоза. При инвазии *N.apis* в кишечнике пчел, во-первых, увеличивается число как условно патогенных, так и патогенных микробов, которые здесь становятся доминирующими; во-вторых, у некоторых условно патогенных (*Bac. megathericus*) и патогенных

(*Bac. alvei*) значительно возрастает вирулентность.

## ВЫВОДЫ

На основании проведенных исследований можно заключить, что при инвазии организма пчел *N. apis* в кишечнике насекомых формируется микропаразитоз с преобладанием высокопатогенных бактерий, в результате чего развивается ассоциативное заболевание протозойно-бактериальной этиологии.

Развитие нозематозного процесса, приводящее к гипотонии или полной атонии средней кишки, а также накоплению в ней продуктов распада, благоприятно влияет на увеличение количественного состава

микрофлоры, где преобладающими являются патогенные *Staph. aureus*, *Staph. muscae*, *Staph. epidermidis*, *E. coli*, *Strept. apis*, *Str. epidermidis*, *Str. disparis*.

#### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Желдакова, Р.А. Выделение и идентификация микроорганизмов/ Р.А. Желдакова. – Минск: БГУ, 2003. – 26с.
- 2 Vecnel, J.J., Andreadis, T.G. Microsporidia in insects //The microsporidia and microsporidiosis. – 1999. –Р.447 – 501.
- 3 Гробов, О. Ф. Роль микрофлоры в патогенезе нозематоза пчел / О.Ф. Гробов // Ветеринария. – 1971.– №8. – С.57 – 58.
- 4 Glinski, Z. Defense strategies of the honey bee to fungal infections//Annales Universitatis Maia Sklodowska-Curie. – Lublin Polonia, 2001.Vol.LI,6.– P.39 – 47.
- 5 Евтеева, Н.И. Энтерофлора медоносных пчел / Н.И. Евтеева, А.И.Речкин, В.Н Крылов// Пчеловодство. – 2009. – №8. – С. 6 – 7.
- 6 Павлова, И.Б. Нозематоз пчел /И.Б. Павлова, А.Б. Сохликов//Пчеловодство. – 2002.–№4. – С.64 – 65.
- 7 Смирнов, А.М. Некоторые особенности биологии возбудителя нозематоза / А.М. Смирнов, А.Б. Сохликов//Пчеловодство, 1995. – № 3.– С.22 – 24.

УДК 619:616.98:579.887.111:636.4

Тяпша Ю.И., научный сотрудник

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского», г. Минск

### ПОЛУЧЕНИЕ АНТИСЫВОРОТОК К АНТИГЕНАМ *MYCOPLASMA HYORNEUMONIAE*, *MYCOPLASMA HYORHINIS* И *ACHOLEPLASMA LEIDLAVII*

#### Резюме

В статье описываются методы получения антител к *Mycoplasma hyorhynis*, *Mycoplasma hyorhynis* и *Acholeplasma leidlavii* путем гипериммунизации кроликов.

#### Summary

The review about methods of producing antibodies to *Mycoplasma hyorhynis*, *Mycoplasma hyorhynis* and *Acholeplasma leidlavii* by hyperimmunisation rabbits.

Поступила в редакцию 31.10.2014 г.

#### ВВЕДЕНИЕ

Микоплазмы – своеобразная группа мельчайших микроорганизмов без ригидной клеточной стенки, которые как вирусы размножаются в клетках, но как бактерии растут на питательных средах [1, 7].

При микоплазмозе отсутствуют специфические клинические признаки, хотя часто при патологоанатомическом исследовании поражение верхушечных и сердечных долей легких является специфичным

[1, 5].

По данным R. F. Ross (1996) от 30 до 80% свинополовья заражено микоплазмами, причем некоторые виды, персистируя в дыхательном тракте, разрушают реснитчатый эпителий, в результате чего активизируются другие этиологические агенты пневмоний. Развивающаяся респираторная патология приводит к снижению усвояемости кормов на 14–20%, среднесуточного прироста живой массы на 16–30% и потере

в конечном итоге около 25 кг мяса на 1 голову [9, 12]. Считается, что ущерб от микоплазмозной инфекции в расчете на все свиноголовье составляет 1,67 – 2,8 долларов на голову [10]. *M. hyorhyniae* является и типичным первичным патогеном, паразитирующим на реснитчатом эпителии, создающая зону пониженной резистентности, что облегчает колонизацию тканей легкого возбудителями актинобактериальной пневмонии, пастереллами, стафилококками, стрептококками, патогенными вирусами и другими микоплазмами (*M. hyorhyniae* и *M. hyosynoviae*), которые в ассоциации вызывают респираторную патологию, а также полисерозит и полиартрит [2, 3, 7]. Поэтому, как правило, *M. hyorhyniae* инфекция протекает в ассоциации с другими возбудителями болезней. Соответственно, отсутствуют четкие специфические признаки болезни, а при бактериологической диагностике чаще выделяются вторичные патогены [8].

Поэтому немаловажное значение занимает диагностика *M. hyorhyniae* инфекции. При создании диагностических наборов необходимы специфические сыворотки к антигенам диагностируемой инфекции, а также к другим антигенам, если подозревается наличие перекрестных ложноположительных реакций с ними [11]. Перед нами стояла цель получить наиболее активные сыворотки к *M. hyorhyniae*, а также к *M. hyorhyniae* и *A. leidlavii*, так как они являются родственными видами и принадлежат к одному и тому же классу *Mollicutes*. Антисыворотки к *M. hyorhyniae* и *A. leidlavii* в дальнейшем можно использовать для оценки специфичности тест-систем, а также использовать для изоляции чистой культуры *M. hyorhyniae* в селективных средах.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Антигенами для гипериммунизации служили смывы роста бактерий *M. hyorhyniae*, *M. hyorhyniae* и *A. leidlavii* с двухсоставной питательной среды, которая состояла из твердой фазы в виде агара

Noble для прикрепления клеток микоплазм и жидкой части – в виде жидкой питательной среды, выполняющей роль субстрата.

Антигены инактивировали 0,4% теотропином (конечная концентрация) в течение 36 часов [6].

Жидкую фазу питательной среды центрифугировали при 6g в течение часа. Полученный осадок ресуспензировали в 0,15M растворе NaCl с pH 7,4 и повторяли центрифугирование в том же режиме. Отмывку повторяли еще 2 раза. Полученные антигены хранили в замороженном состоянии при температуре минус 20°C.

При иммунизации испытывались разные способы, дозы, кратность введения антигена и места инъекции. За основу были взяты методы получения антивидовых сывороток согласно методическим рекомендациям [4]. Нами в качестве адъюванта было использовано минеральное масло ISA 70 вместо полного адъюванта Фрейнда, а также другие концентрации вводимых антигенов.

Для гипериммунизации использовали 6 групп (по 5 голов) клинически здоровых кроликов живой массой 2,5 – 3,0 кг.

Иммунизацию антигеном *M. hyorhyniae* проводили по схемам:

1 – группе кроликов вводили внутримышечно по 0,5 мг белка в две точки по 0,5 мл с ISA 70 (1:1) в область поясницы трижды через 7 суток;

2 – применялась комбинация внутримышечного введения и внутривенных инъекций (внутримышечно по 0,5 мг антигена по 0,5 мл с ISA 70 (1:1) в область поясницы, трижды через 7 суток, на 4-й неделе внутривенные инъекции – 0,5 мг в первый день, на второй день – 1 мг, на третий – 2 мг, на четвертый – 4 мг белка *M. hyorhyniae*;

3 – комбинация внутримышечных и внутрибрюшинных инъекций по той же схеме.

Через 5 дней после последнего введения антигена проводили второй и третий циклы иммунизации для второй и третьей схемы. Через десять суток после заключительной инъекции брали кровь для

контроля накопления антител. Контрольной группе вводили 0,15М раствор NaCl с рН-7,4.

Продолжительность цикла иммунизации составила 24 суток в 1-й схеме и 39 суток – во 2-й и 3-й. Исследование сывороток проводили через 14 дней после заключительного введения антигена.

Иммунизацию кроликов антигенами *M. hyorhinis* и *A. leidlavii* провели по схеме, давшей лучшие результаты накопления антител к *M. hyopneumoniae*.

Сыворотки кроликов исследовали в непрямом конкурентном ИФА с конъюгатом набора SERELISA® M.hyoр. Отрицательным контролем служила нормальная сыворотка кроликов.

Протокол постановки ИФА:

1 Положительный антиген *M. hyopneumoniae* вносили на панели фирмы Enhanced binding Microtiter Assembly по 100 мкл в лунки с концентрацией антигена 25 мкг/мл. Антиген предварительно растворяли в 0,02М ФСБ с рН 7,2. Панель закрывали крышкой и переносили в термостат, выдерживали при температуре 37<sup>0</sup>С в течение 1 часа.

2 После инкубации панель освобождали от содержимого путем стряхивания и 4-кратно промывали, внося в каждую лунку по 0,25 мл 0,02 М ФСБ-Т с рН 7,2-7,5 восьмиканальной автоматической пипеткой.

3 Для блокировки панелей растворяли в 0,02 М ФСБ с рН 7,2 сухое молоко до конечной концентрации 0,5% и вносили по 100 мкл в лунки панели. Панель закрывали крышкой и переносили в термостат, выдерживали при температуре 37<sup>0</sup>С в течение 1 часа.

4 После инкубации панель освобождали от содержимого путем стряхивания и 4-кратно промывали, внося в каждую лунку по 0,25 мл ФСБ-Т с рН 7,2.

5 Контрольные и исследуемые сыворотки крови разводили 1:10 в 0,02 М ФСБ с рН 7,2 и вносили по 100 мкл в соответствующие лунки иммунологической панели. Панели закрывали крышкой и инкубировали при температуре 37<sup>0</sup>С 1,0 час.

6 Без промывания вносили конъюгат фирмы SERELISA (моноклональные антитела к антигену *M. hyopneumoniae*) во все лунки панели по 100 мкл. Панель закрывали крышкой и переносили в термостат, выдерживали при температуре 25<sup>0</sup>С в течение 30 мин. После этого лунки панели освобождали от содержимого путем 4-кратного стряхивания и промывали, внося по 0,25 мл 0,2 М ФСБ-Т с рН 7,2 в каждую лунку.

7 Во все лунки панели вносили по 100 мкл субстратного буферного раствора (ТМБ). После внесения субстратной смеси панели помещали в темное место, через 15 – 20 минут реакцию останавливали добавлением в каждую лунку 100 мкл раствора серной кислоты с массовой долей 10%.

Учет результатов иммуноферментного анализа проводили, измеряя оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Реакцию учитывали, если отношение между показателями оптической плотности (ОП) отрицательного и положительного контролей  $K^-/S^+$  составляло  $\geq 2,0$  (коэффициент снижения оптической плотности).

Определение концентрации белка в полученных иммуноглобулинах проводили методом Бредфорд. Данный метод основан на реакции красителя кумасси (coomassie) с аргинином и гидрофобными аминокислотными остатками. Связанная форма имеет голубую окраску с максимумом поглощения при 595 нм. Метод предназначен для работы с концентрациями белка в пределах от 2 мкг/мл до 120 мкг/мл.

Используемые реагенты для исследования 40 проб:

спирт ректификат – 400,0 мкл;  
дистиллированная вода – 4500,0 мкл;  
ортофосфорная кислота – 800,0 мкл;  
кумасси – 300 мкл.

При получении иммуноглобулинов класса G (IgG) из антисывороток к *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* и *A. leidlavii* антисыворотки смешивали с каприловой кислотой (10мл сыворотки и 0,75 мл каприловой кислоты), через 1 ч образовавшийся

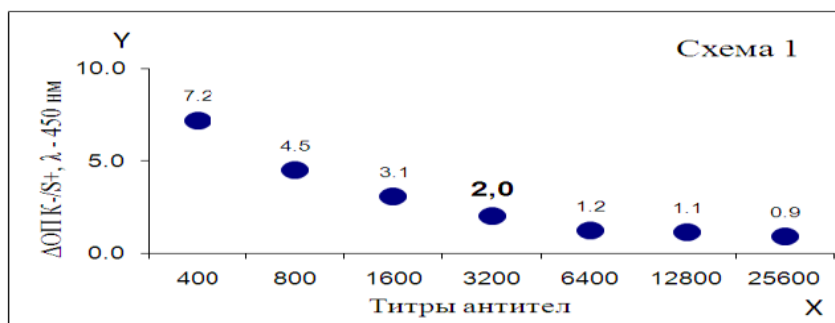
осадок удаляли центрифугированием. Каприловую кислоту удаляли диализом против 0,05М ФСБ (500 мл) при температуре 4<sup>0</sup>С в течение 5 часов. IgG из диализированной антисыворотки осаждали сульфатом аммония 40% насыщения. Осадок растворяли и трехкратно диализировали против 3ФР (500 мл) при 4 <sup>0</sup>С в течение 5-ти часов.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

После проведения цикла гипериммунизации, на 10-й день после последней инъекции антигена, сыворотки кроликов каждой опытной группы соединяли в один пул, из которого делали последовательные разведения: 1:400–1:25600. Наилучшим методом иммунизации считался положительный

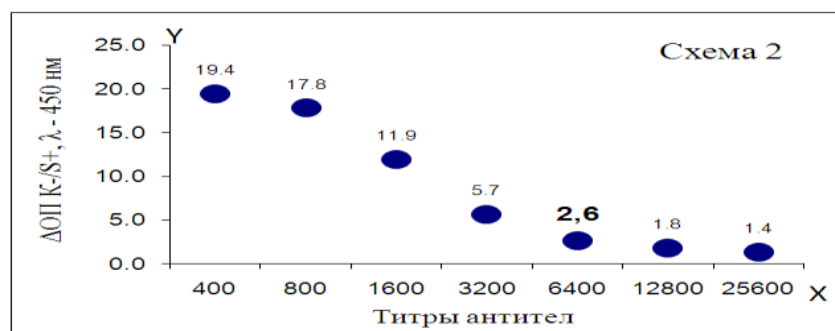
результат исследуемых кроличьих сывороток (S+) в ИФА в наибольшем разведении. На рисунках 1, 2 и 3, а также в таблице 1 представлены результаты определения в ИФА накопления специфических антител к *M. hyor pneumoniae* при иммунизации кроликов по разным схемам. Более высокие титры антител отмечены при использовании 2-й и 3-й схем иммунизации, где был получен положительный результат в ИФА исследуемых сывороток в разведении 1:6400, в то время как по 1-й схеме наблюдали положительный результат только при разведении сывороток 1:3200.

Реакцию учитывали, если отношение между показателями оптической плотности (ОП) отрицательного и положительного контролей К<sup>-</sup>/S<sup>+</sup> составляло  $\geq 2,0$ .



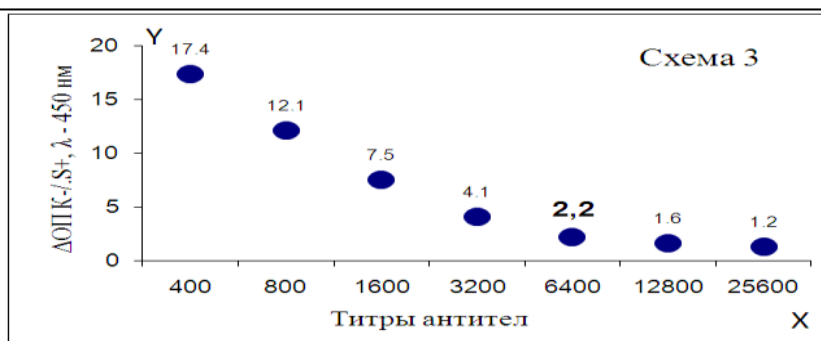
Примечание – ось Y – отношение оптической плотности K-/S+ при длине волны 450 нм; ось X – титры антител в разведениях; K- – нормальная сыворотка кроликов; S+ – исследуемая сыворотка крови кроликов; P < 0,05

**Рисунок 1 – Титры антител в сыворотке крови к *M. hyor pneumoniae* через 10 дней после последней инъекции антигена, схема 1 (внутримышечная иммунизация)**



Примечание – ось Y – отношение оптической плотности K-/S+ при длине волны 450 нм; ось X – титры антител в разведениях; K- – нормальная сыворотка кроликов; S+ – исследуемая сыворотка крови кроликов; P < 0,05

**Рисунок 2 – Титры антител к *M. hyor pneumoniae* в сыворотке крови через 10 дней после последней инъекции антигена, схема 2 (внутримышечная иммунизация с внутривенными инъекциями)**



Примечание – ось Y – отношение оптической плотности К-/К+ при длине волны 450 нм; ось X – титры антител в разведениях; К- – нормальная сыворотка кроликов; S+ – исследуемая сыворотка крови кроликов; P < 0,05

**Рисунок 3 – Титры антител к *M. hyorhyniae* через 10 дней после последней инъекции антигена, схема 3 (внутримышечная иммунизация с внутрибрюшинными инъекциями)**

Таблица 1 – Схемы введения антигена *M. hyorhyniae* и показатели накопления антител в зависимости от способа иммунизации кроликов

	Инъекции антигена (сутки)														
	*Схема1	1	7	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
**Схема2	1	7	14	21	22	23	24	29	30	31	32	37	38	39	40
***Схема3	1	7	14	21	22	23	24	29	30	31	32	37	38	39	40
Контроль	1	7	14	21	22	23	24	29	30	31	32	37	38	39	40
Доза вводимого антигена, мг															
Схема 1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Схема 2	1	1	1	0,5	1	2	4	0,5	1	2	4	0,5	1	2	4
Схема 3	1	1	1	0,5	1	2	4	0,5	1	2	4	0,5	1	2	4
Контроль	1	1	1	0,5	1	2	4	0,5	1	2	4	0,5	1	2	4
Исследование крови (сутки)															
Схема 1	1	14	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Схема 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	37	-	-	-	58
Схема 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	37	-	-	-	58
Контроль	1	14	28	-	-	-	-	-	-	-	37	-	-	-	58
Титры антител															
Схема 1	0	1600	3200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Схема 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1600	-	-	-	6400
Схема 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3200	-	-	-	6400
Контроль	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	0

Примечание – \*Схема 1 – внутримышечная иммунизация; \*\*Схема 2 – внутримышечная иммунизация с внутривенными инъекциями; \*\*\*Схема 3 – внутримышечная иммунизация с внутрибрюшинными инъекциями

В дальнейшей работе использовали антисыворотки, полученные по 2-й схеме, так как они имели большие показатели снижения ОП в сравнении с отрицательными и положительными контрольными сыворотками (ΔОП К-/S+ 2,6 при титре антител 6400). Получение антисывороток к антигенам *M. hyorhyniae* и *A. leidlavii* проводили по

второй схеме иммунизации. По окончании цикла иммунизации на 10-й день у кроликов отобрали кровь. В разведении сывороток 1:6400 ДОП К- $\lambda$ S+ гипериммунной кроликов антигеном *M.hyorhinae* составил 2,5, *A. leidlavii* – 3,1

Из антисывороток к *M. hyopneumoniae*, *M.hyorhinae* и *A. leidlavii* выделяли иммуноглобулины класса G (IgG), в итоге были получены очищенные IgG к *M. hyopneumoniae*, *M.hyorhinae* и *Acholeplasma leidlavii* в концентрации 25, 30 и 27 мг/мл соответственно.

## ВЫВОДЫ

1 Получены очищенные IgG к *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinae* и *Acholeplasma leidlavii*.

2 Наибольшее накопление антител в сыворотке крови кроликов наблюдается по схеме с внутримышечными инъекциями трижды через 7 суток по 0,5 мг белка с ISA 70 (1:1) и на 4-й неделе с внутривенными инъекциями по 0,5 мг в первый день, на второй день – 1 мг, на третий – 2 мг, на четвертый – 4 мг белка антигенов микоплазм и затем с интервалами 5 дней проводят второй и третий циклы иммунизации путем внутривенных инъекций.

## ЛИТЕРАТУРА

- 1 Андросик, Н.Н. Микоплазмы в патологии органов дыхания свиней : обзор.информ. / Н.Н. Андросик ; Белорус. науч.-исслед. ин-т науч.-техн. информ. – Минск, 1980. – 40 с.
- 2 Андросик, Н.Н. Об этиологии пневмоний свиней на комплексах / Н.Н. Андросик, А.Е. Испенков; Т.П. Вайцеховская // Ветеринарная наука – производству : науч.тр. / Белорус. науч.-исслед. ин-т эксперимент. ветеринарии им. С.Н. Вышелеского. – Минск, 1985. – Т. 23. –С. 48–52.
- 3 Кукушкин, С.А. Эпизоотология и меры борьбы с репродуктивно-респираторным синдромом свиней в мире и в Российской Федерации / С.А.Кукушкин // Ветеринар.патология.– 2006. – № 4.– С. 89–95.
- 4 Методические рекомендации по постановке серологических реакций при диагностике инфекционных болезней животных : утв. ГУВ МСХ и П РБ 03.03.2008 (№ 10-1-5/129) / А.Э. Высоцкий [и др.] // Справочник по бактериологическим методам исследований в ветеринарии / сост. А.Э. Высоцкий, З.Н. Барановская. – Минск, 2008. – С. 240–278.
- 5 Микоплазмы: молекулярная и клеточная биология, взаимодействие с иммунной системой млекопитающих, патогенность, диагностика / С.Н. Борхсениус [и др.] ; Рос.акад. наук, Ин-т цитологии, Казан. ин-т биохимии и биофизики ; под. ред. С.Н. Борхсениус.– СПб.: Наука, 2002. – 319 с.
- 6 Мистейко, М.М. Специфическая профилактика респираторного микоплазмоза свиней: дис.... канд. ветеринар. наук : 16.00.03 / М.М. Мистейко. – Минск, 2008. – 143 с.
- 7 Орляник, Б.Г. Инфекционные респираторные болезни свиней / Б.Г. Орляник // Пром. и плем. свиноводство. – 2005. – № 3. –С. 39–40.
- 8 Тазаян, А.Н. Сопутствующие инфекции при энзоотической пневмонии свиней / А.Н. Тазаян // Повышение продуктивности сельскохозяйственных животных и птицы на основе инновационных достижений : материалы Всерос. науч.-практ конф., 16–17 июля 2009 г. / Рос. акад. с.-х. наук, Гос. науч. учреждение “Сев.-Кавк. зон. науч.-исслед. ин-т”. – Новочеркасск, 2009. – С. 69.
- 9 Association between growth indicators and volume of lesions in lungs from pigs at slaughter / M.A. Hill [et al.] // Amer. J. of Veterinary Research. – 1992. – Vol. 53, № 12. – P. 2221–2223.
- 10 Braude, R. Effect of enzootic pneumonia on the performance of growing pigs / R. Braude, S. Plonka // Veterinary Rec. – 1975. – Vol. 96, № 16. – P. 359–360.
- 11 Calsamiglia, M. Profiling *Mycoplasma hyopneumoniae* in farms using serology and a nested PCR technique / M. Calsamiglia, C. Pijoan, G.J. Bosch // Swine health and production. – 1999. – Vol. 7, № 6. – P. 263–268.
- 12 Pfützner, H. Die ätiologische und ökonomische Bedeutung von *Mycoplasma hyopneumoniae* im Komplex der respiratorischen Erkrankungen des Schweines / H. Pfützner, Th. Blaha // Tierärztliche Umschau. – 1995. – Vol. 50, № 11. – P. 759–765.

**Рыженко В.П.**, доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент НААН  
**Нычик С.А.**, доктор ветеринарных наук  
**Рыженко Г.Ф.**, кандидат биологических наук  
**Горбатюк О.И.**, кандидат ветеринарных наук  
**Андрияшук В.А.**, кандидат ветеринарных наук  
**Жовнир А.М.**, научный сотрудник  
**Рудой А.В.**, научный сотрудник  
**Уховская Т.Н.**, научный сотрудник

*Институт ветеринарной медицины НААН Украины, г. Киев*

## НАУЧНОЕ СОПРОВОЖДЕНИЕ ПРОФИЛАКТИКИ АЭРОБНЫХ, АНАЭРОБНЫХ И АССОЦИИРОВАННЫХ ИНФЕКЦИЙ

### *Резюме*

*В статье изложены теоретическое и экспериментальное обоснование стратегии специфической профилактики аэробных, анаэробных и смешанных инфекций. Освещены достижения научного коллектива в разработке эффективных средств специфической защиты животных. В частности, авторы считают, что изменение климата, экологические и техногенные факторы повышают актуальность проблем анаэробных инфекций и переводят их в категорию «болезней будущего».*

### *Summary*

*The article describes theoretical and experimental substantiation of the strategy for the specific prevention of aerobic, anaerobic and mixed infections. Achievements of the research team in the development of effective tools specific for the protection of animals. In particular, the authors believe that climate change, environmental and technological factors increase the urgency of the problems of anaerobic infections and translate them into the category of «diseases of the future».*

*Поступила в редакцию 30.10.2014 г.*

### **ВВЕДЕНИЕ**

Роль анаэробных микроорганизмов в природе многогранна и неопределима. Значительная их часть широко используется в народном хозяйстве, особенно в производстве витаминов, органических кислот, спиртов и многих других веществ.

Ряд анаэробных микроорганизмов персистирует в организме животных и человека, принимая участие в процессах пищеварения, обеспечивая его жизненно необходимыми продуктами.

Наибольший интерес для ветеринарной и гуманной медицины представляют микроорганизмы рода клостридий, насчитывающий 120–160 видов, из которых около 30 являются патогенными, а 8 видов – истинными патогенами, наиболее значимыми для ветеринарной медицины. Из 17

видов рода фузобактерий наибольший интерес представляют 2 вида – *F. necrophorum* и *F. nucleatum*. Из бактероидов в центре внимания больше всего находятся *B.fragilis*, *B.melaninogenicus* и *B.nodosus* [1].

Следует отметить, что некоторые виды клостридий (*Cl. botulinum*, *Cl. tetani*, *Cl. perfringens* и др.) относятся к арсеналу биологического оружия и потенциальных средств биотерроризма. В тоже самое время все больше возрастает вероятность заноса на территорию государства возбудителей эмерджентных заболеваний, особенно с животными или импортированной продукцией животного и растительного происхождения [2].

В последние годы в США и Канаде часто регистрируются случаи вспышек ботулизма лошадей и крупного рогатого скота,

возникающие вследствие скармливания контаминированных *Cl. botulinum* кормов. Нередко погибает 50–90% животных. Описан случай, когда на ферме, где содержалось 441 гол. коров, в течение 8 суток после появления первых признаков заболевания погибло 427 голов (96,8%) [3].

В Германии наблюдали случаи внезапной гибели коров от интоксикации ботулотоксином. При исследованиях был обнаружен токсин, а возбудителя выделить не удалось. Известны случаи гибели детей раннего возраста от употребления меда, содержащего ботулотоксин [4].

Потенциальную опасность представляет бациллярная гемоглобинурия животных (иктерогемоглобинурия), которая сопровождается или гибелью 98,0 – 100,0 % заболевших в течение 2 – 4 дней или внезапной смертью.

Животноводство многих стран мира несет ощутимые убытки от заболевания некробактериоз (фузобактериоз). Непосредственно с импортом племенных животных связано распространение в Украине некробактериоза и актинобациллеза (лигниериоза). Серьезную угрозу свиноводству государства представляют заболевания, вызываемые *Cl. difficile*, которые получили распространение в США. Большую опасность представляют продукты животноводства, особенно птицеводства, контаминированные *Cl. perfringens* [5].

Озабоченность вызывает высокая антибиотикорезистентность анаэробных и ассоциированных с ними аэробных микроорганизмов.

Несмотря на достижения науки в области диагностики анаэробных инфекций, она остается дорогой, сложной и, зачастую, запоздалой.

Исходя из изложенного выше, можно сделать заключение, что наиболее эффективным методом профилактики аэробных, анаэробных и смешанных инфекций является научно обоснованная иммунизация животных с применением многокомпонентных ассоциированных вакцин.

**Цель работы** – ознакомить научных

работников и специалистов с основными направлениями исследований, направленных на разработку интегральной системы защиты животных и человека от аэробных, анаэробных и смешанных инфекций, включая разработку средств специфической защиты.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в условиях Института ветеринарной медицины НААН Украины в тесном сотрудничестве с коллективами государственных лабораторий и ветеринарных учреждений республиканского, областного и районного уровня, а также специалистами животноводческих хозяйств.

В работе использованы результаты собственных исследований по изучению причин распространения и особенностей течения аэробных, анаэробных инфекций, по индикации и идентификации патогенов, изучению культурально-морфологических, биохимических, биологических и молекулярно-генетических свойств возбудителей инфекционных заболеваний у лошадей, крупного рогатого скота, овец, свиней и птицы.

Для решения сложившихся проблем профилактики анаэробных инфекций в 1996 г. впервые в Украине была создана лаборатория анаэробных инфекций, а в 2004г. при ней был открыт научно-исследовательский референс-центр по изучению и профилактике анаэробных инфекций.

Согласно разработанным Положениям о лаборатории и Центре предусмотрен широкий круг их деятельности, определены задачи до 2020 года. Из 13 членов коллектива лаборатории – 10 научных сотрудников. В решении актуальных задач принимают участие аспиранты и соискатели учёной степени.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исходя из эпизоотической ситуации в животноводстве Украины в обязанности коллектива лаборатории включен

---

эпизоотологический мониторинг одновременно 12 болезней: ботулизма, бациллярной гемоглобинурии, браздота, анаэробной (инфекционной) энтеротоксемии, анаэробной дизентерии молодняка, злокачественного отека, эмкара, некротического гепатита, некробактериоза (фузобактериоза), столбняка, лигниериоза (актинобациллез), копытной гнили.

В первую очередь внимание было сосредоточено на изучении эпизоотической ситуации по этой группе болезней и определении первоочередных задач научных исследований [6, 7].

Установлено, что в 90-е годы XX века Украина практически полностью использовала импортные биопрепараты для вакцинопрофилактики анаэробных инфекций. В стране отсутствовала коллекция местных вакцинных штаммов возбудителей анаэробных инфекций. В то же время в связи с импортом племенных животных появились почти новые для Украины заболевания актинобациллез (лигниериоз) и некробактериоз [8, 9].

Решая неотложные задачи, коллектив лаборатории за 15 лет – её деятельности выполнил значительный объем диагностической работы, благодаря которой удалось решить целый ряд проблем.

Научное сопровождение диагностической работы состояло в следующем. Сотрудниками лаборатории осуществлялись выезды в хозяйства, где было заподозрено на возникновение анаэробных инфекций. В лаборатории института исследовали отобранный патологический и биологический материал, идентифицировали возбудители болезней и изучили их антибиотикочувствительность. Выделенные возбудители использованы для изготовления аутовакцин. Чаще приходилось изготавливать ассоциированные инактивированные вакцины.

С крупными хозяйствами составляли договора на 3 – 5 лет о научно-техническом сотрудничестве. Главной целью этого сотрудничества было оздоровление хозяйства и разработка комплекса мероприятий по поддержанию их эпизоотического благопо-

лучия.

В результате такой деятельности нами было выделено более 1000 патогенов, после соответствующего анализа создан музей анаэробных микроорганизмов, депонировано 27 вакцинных штаммов.

Известно, что от скорости и уровня диагностики заболевания зависит эффективность оздоровительных мероприятий. Для повышения уровня диагностической работы сотрудниками лаборатории разработаны методические рекомендации по диагностике 10 анаэробных заболеваний, ГОСТ по лабораторной диагностике клостридиозов, 2 отраслевых стандарта по диагностике актинобациллеза и фузобактериоза.

Наряду с методическим обеспечением диагностической работы нами разработаны 2 диагностикума: тест-система «ИФА-фузобактериоз» и тест-система «ПЦР-фузобактериоз».

Кроме того, разработаны методические рекомендации по отбору проб биоматериала для исследования на анаэробные инфекции и по определению антибиотикочувствительности анаэробных микроорганизмов [10, 11].

На основании результатов изучения наиболее распространенных ассоциаций микроорганизмов, выделенных в случаях подозрения на анаэробные инфекции, нами изготовлен ряд экспериментальных образцов аутовакцин. Восемь из них прошли государственную регистрацию: *Вельшисан* – против анаэробной энтеротоксемии и анаэробной дизентерии молодняка; *Сальмосан* – против сальмонеллезов животных; *Вельшисальм* – против анаэробной энтеротоксемии, анаэробной дизентерии и сальмонеллеза животных; *Сердосан* – против клостридиозов, колибактериоза, сальмонеллеза, пастереллеза и кокковых инфекций свиней; *Пневмомастисан* – против эндометритов, маститов и пневмоэнтеритов крупного рогатого скота; *Актиносан* – против лигниериоза (актинобациллеза, псевдоактиномикоза) животных; *Некросан* – против клостридиозов и некробактериоза животных; *Овисан* – против клостридиозов овец.

Все 8 вакцин ежегодно экспонируются на международных с-х выставках, проходящих в Украине. Вакцина «Актиносан», не имеющая аналогов, в 2008 г. вошла в число экспонатов, награжденных золотой медалью [12].

Исходя из эпизоотической ситуации в отдельных регионах Украины и учитывая этиологическую структуру бактериозов разных видов животных, по заказам специалистов хозяйств нами изготовлен целый ряд эффективных вакцин. На некоторые из них утверждена НД, а некоторые проходят апробацию в соответствии с временными наставлениями по их применению. Наиболее значимы из них: *Некросан-2* – против некробактериоза и колибактериоза; *Некросан-3* – против некробактериоза и копытной гнили; *Некросальм* – против некробактериоза и сальмонеллеза; *Некроколисальм* – против некробактериоза, колибактериоза и сальмонеллеза; *Фузоактиносан* – против некробактериоза и актинобациллеза; *Актиноколисан* – против актинобациллеза и колибактериоза; *Вельшикол* и *Вельшиколисан* – против анаэробной энтеротоксемии, анаэробной дизентерии молодняка, отечной болезни и колибактериоза; *Вельшиколисальм* – против анаэробной энтеротоксемии, анаэробной дизентерии молодняка, колибактериоза и сальмонеллеза; *Вельшипаст* – против перфрингиозов и пастереллеза; *Полиависан* – против перфрингиозов, колибактериоза и сальмонеллеза гусей и др. видов птицы; *Эквисан* – против клостридиозов, колибактериоза и кокковых инфекций лошадей [13 – 15].

Кроме того, нами изготовлены и успешно апробированы аутовакцины «Пневмосан», «Клебсан», «Гемофилосан», «Листерикол», «Папилломасан» и др. В настоящее время мы испытываем октовакцину «Мультибовисан».

Все вышеперечисленные вакцинные препараты изготовлены на основе адьюванта – стерильного раствора гидроокиси алюминия в определенной концентрации с временем адсорбции до 48 ч. Концентрация микробных клеток в разработанных вакцинах колеблется от  $2,2 \times 10^9$  до  $3,4 \times 10^9$  м. кл. / см<sup>3</sup> в зависимости от состава

препарата. После применения вакцинных препаратов продолжительность напряженного иммунитета составляет не менее 6 мес.

Нередко нам приходилось работать в условиях, когда в стаде находилось 20,0 – 50,0 % больных животных, где поголовная вакцинация была невозможна. Выходом из такой ситуации стало включение в состав вакцины иммуностимулирующего компонента природного происхождения на основе продуктов пчеловодства и экстрактов лекарственных растений по рецепту докт. вет. наук, профессора В. П. Рыженка. В результате этого все наши вакцины не имеют ограничений в применении как с профилактической, так и с лечебной целью.

В отдельных случаях, когда наблюдается наличие разной патологии у животных или имеются осложнения при применении некоторых вирусных вакцин, специалисты испытывают затруднения при осуществлении плановых или вынужденных лечебно-профилактических мероприятий. В таких ситуациях в помощь специалистам разработаны два иммуностимулирующих препарата: БСП – на бактериальной основе и СТП – тканево-растительный препарат. Они успешно применяются при патологии воспроизводства, при лечении некробактериоза и ряда других патологий.

В связи с разработкой различных вакцин нам приходится испытывать затруднения при определении оптимальных соотношений антигенов в сложном препарате, при выборе методических подходов при изучении гуморального и клеточного иммунитета и при использовании нанопрепаратов в биотехнологии.

За 16 лет деятельности лаборатории, нами получено 62 патента, опубликовано 170 научных работ, получено несколько десятков дипломов, грамот и наград.

## ВЫВОДЫ

1 Наиболее эффективным средством защиты животных от анаэробных инфекций является широкая вакцинация с применением ассоциированных вакцин.

2 Особенности эпизоотического процесса при актинобациллезе и некробактериозе в некоторых регионах страны зависят от количества импортированных животных, а также от их перемещения внутри страны.

3 Вакцинация импортированного скота против некробактериоза и клостридиозов не только резко сокращает его заболеваемость, но и продлевает срок использования коров на 1 – 2 лактации.

4 При выделении от больных животных 3 – 8 возбудителей наиболее эффективным лечебно-профилактическим мероприятием является применение инактивированных ассоциированных аутовакцин

5 Широкое использование аутовакцин, которые содержат средства природного происхождения, стимулирующие синтез антител, является важным направлением

профилактики острых вспышек инфекционных заболеваний и осуществления комплекса оздоровительных мероприятий.

6 Внедрение в практику разработанных собственных средств специфической защиты животных полностью освобождает государство от необходимости импорта вакцин против аэробных, анаэробных и ассоциированных инфекций.

### ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исходя из актуальности проблемы аэробных, анаэробных и ассоциированных инфекций, существует необходимость совершенствования методов диагностики, качества биопрепаратов и расширения масштабов вакцинопрофилактики.

### ЛИТЕРАТУРА

1 Риженко, В.П. Анаеробні інфекції сьогодні і в майбутньому / В. П. Риженко // Ветеринарна біотехнологія. – Бюл. № 9. – 2006. – С. 227 – 149.

2 Риженко, В.В. Епідеміологічний моніторинг харчових токсикоінфекцій, викликаних *Clostridium perfringens* // Проблеми військової охорони здоров'я / Риженко В. В. – Київ, 2006. – Вип. 16 – С. 273 – 283.

3 Kelch, W.I., Kerr L.A. Pringle Fatal *Clostridium botulinum* toxicosis in eleven Holstein cattle fed round bale barley haulage // *Vet. Dragn. Invest.* – 2000, Sept. 12 (5). – P. 433 – 435.

4 Ничик, С.А., Риженко, В.П., Риженко, В.В. Ботулізм. Біобезпека і біозахист // Ветеринарна медицина. Міжвід. темат. наук. Збірник: Харків, 2012. – Вип. 96. – С. 114 – 116.

5 Риженко, В.В. Стратегія специфічної профілактики деяких анаеробних інфекцій спільних для людини і тварин / В. В. Риженко // Ветеринарна біотехнологія. – К., 2006. – Бюл. № 9. – С. 220 – 226.

6 Риженко, В.П. Теоретичне та експериментальне обґрунтування розробки нових вакцин / В. П. Риженко [и др.]. // Ветеринарна біотехнологія. – К., 2008. – Бюл. № 13. – С. 51 – 62.

7 Риженко, В.В. Математичне моделювання інфекційного процесу при токсикоінфекціях, зумовлених *Clostridium perfringens* / В.В. Риженко // Ветеринарна біотехнологія. – К., 2008. – Бюл. № 12. – С. 209 – 212.

8 Риженко, В.П. Розробка інтегральної системи захисту тварин від фузобактеріозу (некробактеріозу) / В. П. Риженко, Г.Ф. Риженко, О.І. Горбатюк // Науково-технічний бюлетень. – Львів, 2009. – №4 (10). – С. 537 – 546.

9 Риженко, В.П. Відбір біологічного матеріалу для лабораторних досліджень на анаеробні інфекції: методичні рекомендації / В. П. Риженко [и др.]// – Київ, 2011. – 44 с.

10 Визначення чутливості анаеробних мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів: Методичні рекомендації / В.П. Риженко [и др.]// – Київ, 2011. – 48 с.

11 Рудой, О.В. Аспекти комплексної діагностики актинобациллозу (лігніеріозу) великої рогатої худоби / О.В. Рудой // Ветеринарна біотехнологія. – К., 2009. – Бюл. № 15. – С. 366 – 371.

12 Ющенко, М.С. Результати клініко-гематологічних досліджень за одночасного щеплення овець проти некробактеріозу, колібактеріозу та сальмонельозу / М. С. Ющенко // Ветеринарна біотехнологія. – 2010. – Бюл. № 16. – С. 255 – 265.

13 Рыженко, В.П. Бациллярная гемоглобинурия – опасная эмерджентная инфекция / В. П. Рыженко // Ветеринарна медицина: Міжвідомчий тематичний науковий збірник. – Харків, 2010. – Вип. № 94.– С. 147 – 150.

14 Рыженко, В.П. Науковий супровід профілактичних та оздоровчих заходів при фузобактеріозі (некробактеріозі) / В.П. Рыженко [и др.] // Ветеринарна медицина: Міжвідомчий тематичний науковий збірник. – Харків, 2011. – Вип. № 95. – С. 261 – 264.

15 Рыженко, В.П. Імунобіологічна реактивність організму свиней за одночасного щеплення проти фузобактеріозу та сальмонельозу / В. П. Рыженко, Г. Ф. Рыженко [и др.] // Науковий вісник ветеринарної медицини. – Біла Церква, 2012. – Вип. № 9. – С. 134 – 139.

16 Патент України на КМ № 18355, МПК (2006) А 61 К 39 / 00 Вакцина «Некросальм» асоційована інактивована концентрована проти некробактеріозу (фузобактеріозу) та сальмонельозу тварин (Рыженко В. П., Рыженко Г. Ф., Кучерявенко О.О., Дементьева С.А., Андріяшук В.О., Галка І.В., Жовнір О.М.); заявник і патентовласник: Інститут ветеринарної медицини НААН України – заявл. У 2006 03455 від 30.03.2006; опубл. 15.11.2006; Бюл. № 11.

17 Патент України на КМ № 18322, МПК (2006) А 61 К 39 / 00 Вакцина «Некроколісальм» асоційована інактивована концентрована проти некробактеріозу (фузобактеріозу), колибактеріозу та сальмонельозу тварин (Рыженко В. П., Рыженко Г. Ф., Кучерявенко О.О., Дементьева С.А., Андріяшук В.О.); заявник і патентовласник: Інститут ветеринарної медицини НААН України – заявл. У 2006 03451 від 30.03.2006; опубл. 15.11.2006; Бюл. № 11.

18 Патент України на КМ № 18334, МПК А 61 К 39 / 00 Вакцина «Некросан – 2» асоційована інактивована проти некробактеріозу (фузобактеріозу), некротичного гепатиту, злослисного набряку, інфекційної і анаеробної ентеротоксемії та колибактеріозу тварин (Рыженко В.П., Рыженко Г.Ф., Ображей А.Ф., Дементьева С.А., Белік С.М., Каменчук П.П., Хмельницька Н.М.), № ш 00603454; заявл. 30.03.2006; опубл. 15.11.2006; Бюл. № 11.

19 Патент України на КМ № 75306, МПК (2006) А 61 Д 99 / 00 Вакцина «Актиноколісан» асоційована інактивована концентрована проти актинобацильозу та колибактеріозу тварин (Рыженко В.П., Ничик С.А., Рыженко Г. Ф., Горбатюк О.І., Андріяшук В.О., Жовнір О.М., Рудой О.В., Тютюн С.М., Теплюк Н.А., Каменчук П.П.); заявник і патентовласник: Інститут ветеринарної медицини НААН України – заявл. 23.05.2012; опубл. 26.11.2012; Бюл. № 22.

**♦ ветеринарний препарат широкого спектра действия, активный против ДНК- и РНК-содержащих вирусов;**

**♦ применяют с лечебно-профилактической целью при инфекционных заболеваниях вирусной и смешанной (вирусно-бактериальной) этиологии у поросят и телят;**

**♦ предотвращает размножение вирусов;**

**♦ обладает иммуностимулирующей и антитоксической активностью.**

Изготовитель: РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского»

220003, г. Минск, ул. Брикета, 28, тел./факс (+37517) 5088131

По вопросам приобретения препарата Вы можете обратиться в отдел снабжения и сбыта,

тел. (017) 508-81-35 E-mail: bievvm@tut.by



**Спиридонов В.Г.**, доктор сельскохозяйственных наук\*  
**Ситюк Н.П.**, кандидат ветеринарных наук\*\*  
**Мельничук С.Д.**, доктор биологических наук\*  
**Гончаренко В.С.**, старший научный сотрудник\*  
**Нычик С.А.**, доктор ветеринарных наук\*\*  
**Красочко П.А.**, доктор ветеринарных и биологических наук, профессор

\*Украинская лаборатория качества и безопасности продукции АПК НУБиП, г.Киев

\*\*Институт ветеринарной медицины НААН, г. Киев

РУП "Институт экспериментальной ветеринарии им. Вышелесского" г.Минск

## МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ПО ИЗГОТОВЛЕНИЮ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФИТЦ-ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ДЛЯ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

### Резюме

В статье приведены методические подходы по изготовлению специфических ФИТЦ-иммуноглобулинов для иммунофлуоресцентной диагностики африканской чумы свиней. Детально изложены этапы гипериммунизации лабораторных животных рекомбинантным антигеном-аналогом вируса АЧС - rK205R, получения и очистки иммуноглобулинов, их конъюгация со специфическим красителем и сравнение спектрофотометрических характеристик ФИТЦ-иммуноглобулинов АЧС с коммерческим аналогом.

### Summary

The article presents the methodological approaches to the production of specific antibodies to FITC-immunofluorescent diagnosis of African swine fever. Detailed stages of laboratory animals hyperimmunization recombinant antigen analogue of ASF virus - rK205R, preparation and purification of specific antibodies, their conjugation with a specific dye and comparison of spectrophotometric characteristics of FITC-ASF immunoglobulins with commercial counterparts.

Поступила в редакцию 27.10.2014 г.

### ВВЕДЕНИЕ

Африканская чума свиней (АЧС) – контагиозная, высоколетальная болезнь домашних и диких свиней разного возраста и пород, которая регистрируется независимо от поры года [7, 8, 10].

Впервые болезнь была зарегистрирована среди свиней европейских пород Д. Хатчеоном в Южной Африке в 1903 г. и детально описана Монтгомери в 1921 г. [5]. До 60-х годов XX ст. АЧС была широко распространена только в странах Африки. С 1957 г. эпизоотии АЧС были зарегистрированы в Европе, с 1971 г. – в Латинской Америке [6, 8]. В 2007 г. АЧС была занесена с территории Мадагаскара и Мозамбика в Кавказский регион (Грузию, Армению, Азербайджан) и Россию [3, 4, 12].

Сейчас нозоарел АЧС расширяется на территории России (2007–2014 гг.), Украины (2012, 2014 гг.), Белоруссии (2013 год), Литвы (2014 г.), Польши (2014 г.), Эстонии (2014 г.) [21].

Особую роль в ликвидации и профилактике АЧС занимает лабораторная диагностика заболевания. Для выделения вируса АЧС используют образцы лимфатических узлов, селезенки и миндалин, кровь с антикоагулянтом – EDTA или гепарином, костный мозг [9, 13, 18]. Для его выявления применяют реакцию иммунофлуоресценции [6, 13, 14], иммуноферментный анализ [1, 6], реакцию диффузной преципитации [1, 6], реакцию гемадсорбции в культуре лейкоцитов свиней [6, 14], реакцию связывания комплемента [1, 6], иммуноэлектро-

осмофорез, радиоиммунный анализ [6]; для выявления генетического материала вируса – полимеразную цепную реакцию [1, 9, 18].

Наиболее достоверным методом диагностики АЧС является выделение вируса в культурах лейкоцитов свинки в реакции гемадсорбции или аутогемадсорбции [20], но некоторые изоляты вируса АЧС не выявляются этими методами [13]. Поэтому Международное эпизоотическое бюро (МЭБ) рекомендует для диагностики АЧС использовать методы полимеразной цепной реакции и иммунофлуоресценции [15]. В Украине для лабораторной диагностики АЧС используют тест-системы полимеразной цепной реакции и иммунофлуоресценции исключительно зарубежного производства.

**Целью** нашей работы было разработать методические подходы по изготовлению оригинальных отечественных ФИТЦ-иммуноглобулинов для иммунофлуоресцентной диагностики африканской чумы свиней.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Научно-исследовательские работы по изготовлению специфических ФИТЦ-иммуноглобулинов для иммунофлуоресцентной диагностики АЧС проводили в отделе молекулярной диагностики Украинской лаборатории качества и безопасности продукции АПК НУБиП Украины.

Рекомбинантный антиген-аналог вируса АЧС рК205R «LT-Biotech» (Литва) использовали для иммунизации двух лабораторных кроликов весом  $2,0 \pm 0,2$  кг, которым на 1-е, 14-е, 28-е, 42-е и 56-е сутки вводили внутримышечно по 2,0 мг антигена с полным адьювантом Фрейнда (1:1). На 70-е сутки получали специфическую поликлональную сыворотку крови.

Контроль образцов крови кроликов по уровню накопления антител после иммунизации проводили иммуноферментным анализом. Рекомбинантный антиген-аналог вируса АЧС рК205R разводили 0,05 М карбонатным буфером (рН 9,5) и вносили в лунки полистиролового планшета

Maxi Sorb (Nunk) в количестве 10,0 мкг/мл. Планшет инкубировали на протяжении 16–18 часов при температуре  $4^{\circ}\text{C}$ . После инкубации планшет промывали несколько раз раствором для промывки (0,02 М фосфатный буфер и 0,05 % Tween-20 с рН 8,0). Образцы сывороток крови кроликов разводили в 50 раз раствором для отмывки и вносили в лунки планшета, инкубировали при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  на протяжении 60 минут. По окончании инкубации лунки планшета промывали раствором для промывки и вносили в лунки иммуноферментный конъюгат (rSPGP-пероксидаза хрена) [2] в рабочем разведении 1:32000. Инкубацию планшета с конъюгатом проводили в течение 40 минут при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ . Лунки планшета вновь тщательно промывали и вносили раствор с красителем – хромоген тетраметилбензидин (Fluka). После 20 минут инкубации планшета при комнатной температуре реакцию останавливали путем добавления 0,5 М раствора серной кислоты и измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм.

**Выделение иммуноглобулинов класса G из сыворотки крови кроликов.** Иммуноглобулины класса G (IgG) высаливали из сыворотки крови при помощи соли сульфата аммония – 35 % раствор согласно общепринятым методам [11]. Осадок иммуноглобулинов хранили при температуре  $4^{\circ}\text{C}$ .

**Конъюгация IgG с флуоресцентным изотиоцианатом (ФИТЦ).** Осадок IgG растворяли в дистиллированной воде до концентрации 10 мг/мл и высаливали методом эксклюзивной хроматографии на сефадексе G-75 (GE Healthcare Life Sciences), используя хроматографическую систему Biologic LP (BioRad). Хроматографический пик иммуноглобулинов переводили в 0,67 М боратный буфер (рН 8,5), добавляли ФИТЦ (Calbiochem, Molecular biology grade) в соотношении 1:1 по массе и инкубировали один час при комнатной температуре в темноте. После инкубации реакционную смесь очищали на сефадексе G-75. Характерный пик меченых ФИТЦ иммуноглобулинов переводили в 0,02 М фосфатно-

солевой буфер, который содержит 0,25 М NaCl и 0,1% Na<sub>3</sub>. Измеряли УФ-спектры на спектрофотометре BioSpec-Nano (Shimadzu) при длине волны 280 и 494 нм.

**Расчет эффективности конъюгации ФИТЦ-IgG.** Эффективность ковалентного присоединения ФИТЦ к IgG выражали как молярное соотношение ФИТЦ/IgG или F/P, используя формулу 1, концентрацию меченых ФИТЦ иммуноглобулинов подсчитывали по формуле 2 [17, 23]:

$$F/P = \frac{2,77^* \times A_{495}}{A_{280} - (0,35 \times A_{495})^{**}} \quad (1)$$

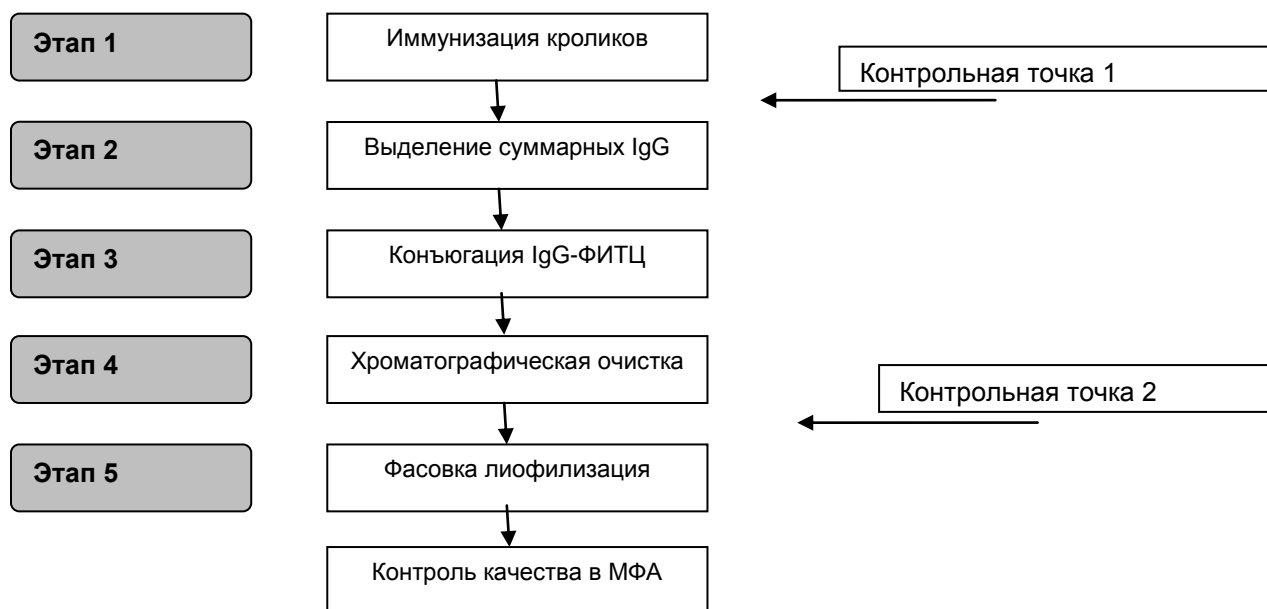
$$IgG \text{ (mg/ml)} = \frac{A_{280} - (0,35 \times A_{495})}{1,4^{***}} \quad (2)$$

Примечание – \*константа для ФИТЦ-IgG конъюгатов; \*\*фактор коррекции, поскольку ФИТЦ поглощает на 280 нм; \*\*\*оптическая плотность IgG (A<sub>280</sub>) при концентрации 1,0 мг/мл

После определения эффективности конъюгации ФИТЦ с иммуноглобулинами и концентрации меченных антител к препарату добавляли 10-тикратное количество бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich), фасовали по 0,5–1,0 см<sup>3</sup> в стеклянную тару, замораживали при температуре 80<sup>0</sup>С и лиофильно сушили в вакуумном сушильном шкафу Telstar Cryodos.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Технологическая блок-схема изготовления специфических ФИТЦ-иммуноглобулинов для иммунофлуоресцентной диагностики АЧС состоит из 5 этапов, представленных на рисунке 1. При этом предусмотрены две контрольные точки: первая точка – контроль за титром антител после иммунизации кроликов рекомбинантным антигеном-аналогом рК205R вируса АЧС; вторая точка – контроль за эффективностью конъюгации ФИТЦ с иммуноглобулинами.



**Рисунок 1 – Блок-схема технологического процесса изготовления ФИТЦ-иммуноглобулинов для иммунофлуоресцентной диагностики АЧС**

В качестве антигена для иммунизации лабораторных животных мы выбрали коммерчески доступный рекомбинантный препарат рК205R производства «LT-Biotech» (Литва). Нами были иммунизиро-

ваны антигеном рК205R два кролика и на 70-е сутки получена специфическая сыворотка с показателями оптической плотности в иммуноферментном анализе 3,12 и 3,56 соответственно (таблица 1).

Таблица 1 – Результат иммуферментного анализа

День после иммунизации	Оптическая плотность 450 нм		
	кролик 1	кролик 2	среднее
0	0,025±0,01	0,030±0,02	0,027±0,015
42	0,85±0,01	1,050±0,01	0,95±0,01
56	2,25±0,02	2,82±0,01	2,535±0,015
70	3,126±0,01	3,56±0,02	3,343±0,015

Из сыворотки крови были выделены суммарные иммуноглобулины класса G, которые в дальнейшем были мечены ФИТЦ. Реакция конъюгации иммуноглобулинов ФИТЦ представлена на рисунке 2.

Реакция конъюгации ФИТЦ происходит между свободными аминогруппами протеинов с образованием стабильной тиомочевинной связи.

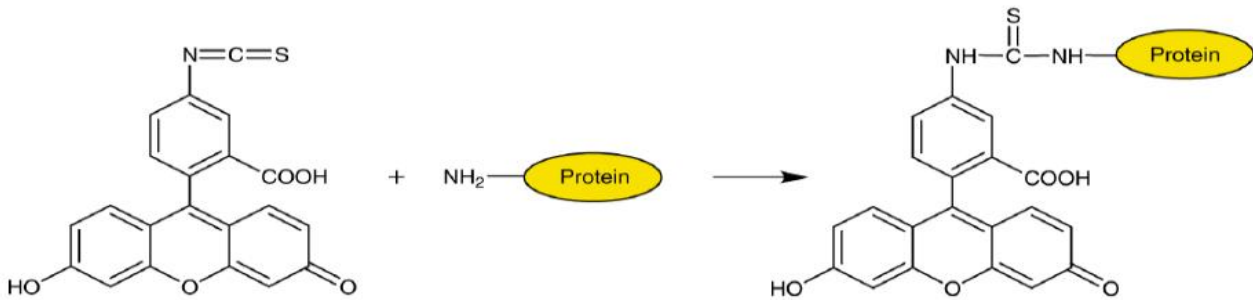


Рисунок 2 – Реакция конъюгации ФИТЦ с протеинами (схема)

После конъюгации ФИТЦ с IgG нами была проведена хроматографическая очистка целевого продукта (конъюгат ФИТЦ-IgG) от продуктов распада ФИТЦ, которые не связались с IgG. На рисунке 3 представлен хроматографический профиль очистки конъюгата. Пик А, который представляет

целевой продукт, собирали в отдельную пробирку и проводили дополнительный спектрофотометрический анализ (контрольная точка 2) качества конъюгации антител ФИТЦ и количества конечного препарата (рисунок 4).

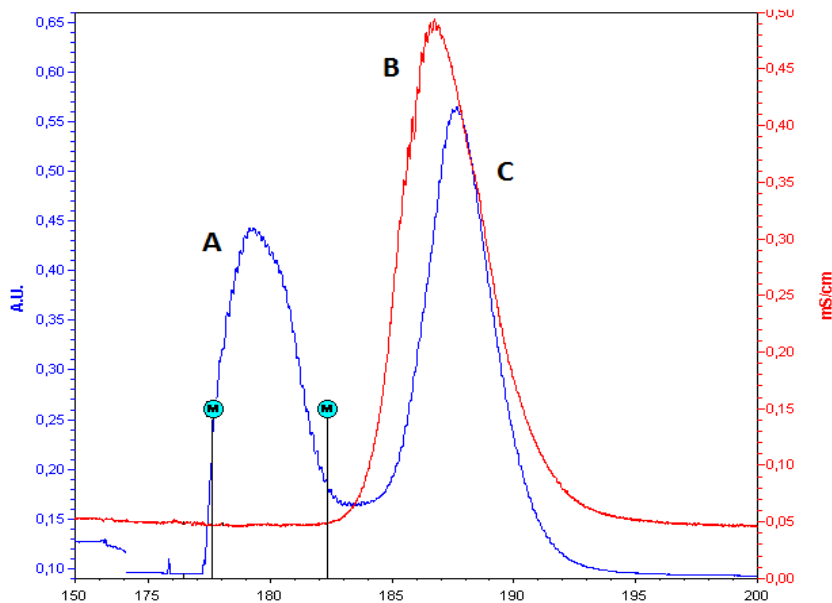
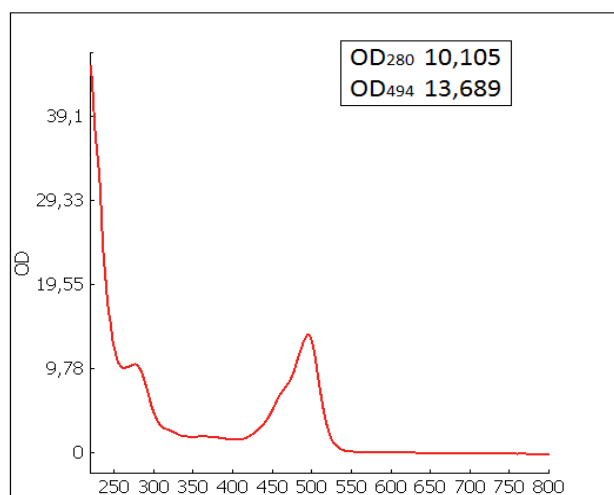


Рисунок 3 – Хроматографический профиль очистки ФИТЦ-иммуноглобулинов

Распределение продуктов реакции проводили на хроматографе Biologic LP (BioRad) с использованием матрицы сефадекс G-75 (размер колонки 20\*500 мм, скорость протока 1 мл/мин). Пик А – целевой продукт (конъюгат ФИТЦ-IgG); пик В –

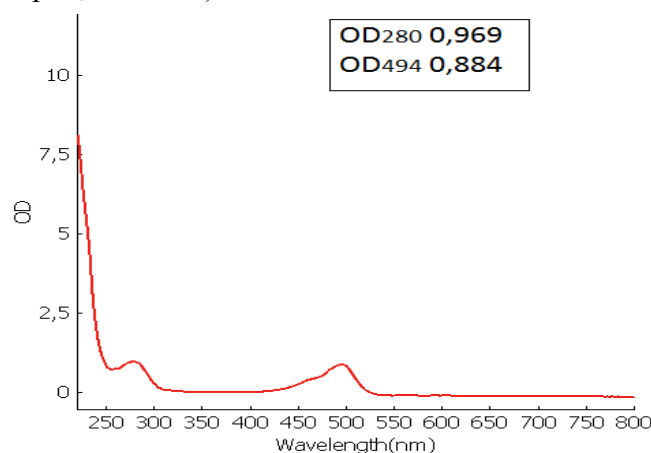
кондуктивность протока; пик С – продукты распада ФИТЦ, которые не связались с IgG. Справа шкала кондуктивности (mS/cm), слева – УФ спектр 280 нм (оптические единицы).



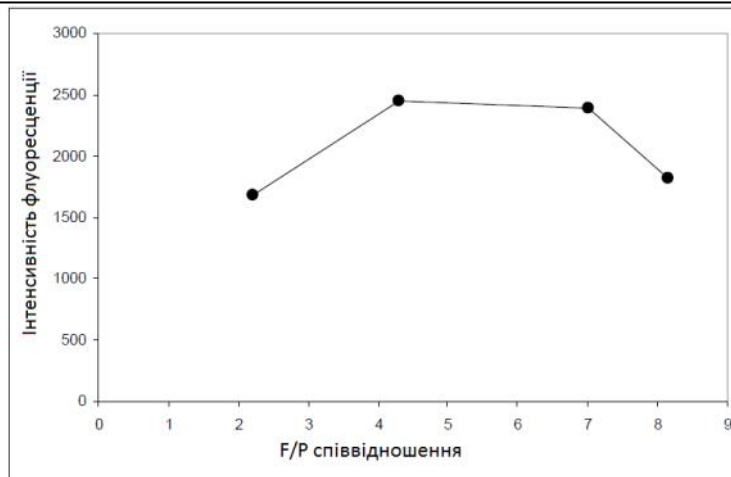
**Рисунок 4 – Контрольная точка 2. УФ-спектры целевого продукта (конъюгат ФИТЦ-IgG) на сканируемом спектрофотометре BioSpec-Nano (Shimadzu)**

Показаны пики оптической плотности (OD) при длине волны 494 и 280 нм. Нижняя шкала – длина волны (нм). Согласно полученным данным (рисунок 4) и формуле (1) нами был получен препарат – меченные ФИТЦ-антитела с соотношением F/P = 7, что указывает на высокое физико-химическое качество полученного конъюгата. Паралельно мы оценили спектрофотометрические характеристики ФИТЦ-иммуноглобулинов АЧС производства ГНУ ВНИИВВиМ (г. Покров, Россия) после

хроматографической очистки на матрице сефадекс G-75. Полученные данные представлены на рисунке 5. После проведения подсчета по формуле (1) мы получили показатель соотношения F/P, который равнялся 3,5. Это свидетельствует о низкой эффективности конъюгации ФИТЦ с иммуноглобулинами. Рекомендованный эффективный диапазон соотношения F/P для ФИТЦ-IgG конъюгатов лежит в пределах 4–7 [22] (рисунок 6).



**Рисунок 5 – Спектрофотометрическая характеристика ФИТЦ-иммуноглобулинов АЧС серия № 06-12 от 06.11.12 производства ГНУ ВНИИВВиМ, г. Покров, Россия**



**Рисунок 6 – Взаємозв'язок між співвідношенням F/P для ФІТЦ-IgG кон'югатів та інтенсивністю флуоресценції ФІТЦ (заїмствований з [23])**

### ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно литературным данным антиген рК205R вируса АЧС является одним из перспективных кандидатов для серологической диагностики АЧС. В работах [16, 19] показано, что именно этот протеин является маркером ранней инфекции (экспрессия начинается с 4-го часа после инфицирования). Этот протеин обладает высоким иммунологическим потенциалом (титр антител обнаруживается на 7-е сутки после инфицирования), является достаточно консервативным среди разных штаммов вируса АЧС (в сравнении с другими антигенами) и характеризуется высокими показателями чувствительности и специфичности в иммуноферментном анализе (91% и 99 %, соответственно).

При получении отечественных ФІТЦ-иммуноглобулинов для детекции антигена вируса АЧС мы параллельно оценили их спектрофотометрические характеристики при сравнении с ФІТЦ-иммуноглобулинами-аналогами производства ГНУ ВНИИВВиМ (г. Покров, Россия). Данные соотношения показателей F/P

свидетельствуют о получении значения 3,5. Такой цифровой показатель является результатом низкой эффективности конъюгации ФІТЦ с иммуноглобулинами, а рекомендованный эффективный диапазон соотношения F/P для ФІТЦ-IgG кон'югатів должен находится по данным [22] в пределах 4–7.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами разработан технологический процесс получения отечественных специфических ФІТЦ-иммуноглобулинов для иммунофлуоресцентной диагностики африканской чумы свиней.

В перспективе дальнейших научных исследований необходимо испытать отечественные специфические ФІТЦ-иммуноглобулины на модели мазков-отпечатков из патологического материала от павших или вынужденно убитых с подозрением на африканскую чуму домашних или диких свиней и сравнить их с коммерческими аналогами.

### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Африканская чума свиней // Вирусные болезни животных / В. Н. Сюрин, А. Я. Самуйленко, Б. В. Соловьев, Н. В. Фомина. – Москва : ВНИТИБП, 1998. – С. 770–787.
- 2 Бактеріальний синтез IgG-зв'язувального домену білка G Streptococcus sp. та перспективи його використання в імунологічній практиці / В. Г. Спиридонов, Д. Ю. Рибальченко, Р. М. Чумак [та ін.] // Мікробіологічний журнал. – 2006. – Т. 68, № 5. – С. 31–35.
- 3 Генкина, Р. Тревожная осень 2010-го. Ученые и руководители государственной ветеринар-

---

ной службы обсудили пути ликвидации АЧС в России / Р. Генкина // Ветеринарная жизнь. – 2010. – № 20. – С. 4–5.

4 Дудников, С. А. Африканская чума свиней – три года "прогресса"/ С. А. Дудников, Л. А. Дудников // Сучасна ветеринарна медицина. – 2011. – № 1. – С. 30–32.

5 Коваленко, Я. Р. Африканская чума свиней / Я. Р. Коваленко, М. А. Сидоров, Л. Г. Бурба. – Москва : Колос, 1972. – 200 с.

6 Козлова, Д. И. Современные проблемы африканской чумы свиней / Д. И. Козлова, В. А. Бесхлебнов. – Москва, 1980. – 60 с.

7 Кушнир, А. Т. Африканская чума свиней (Обзор литературы) / А. Т. Кушнир, Е. М. Хрипунов // Биолого-экологические проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии сельскохозяйственных животных и людей : материалы междунар. науч.-практ. конф. 16–18 апр. 2002 г. – Покров, 2002. – С. 136–140.

8 Ликвидация африканской чумы свиней в Республике Абхазия / В. Н. Герасимов, С. А. Кукушкин, А. В. Мищенко [и др.] // Ветеринария. – 2008. – № 3. – С. 19–24.

9 Пособие по подготовке чрезвычайных планов действий на случай эпидемии африканской чумы свиней / М.-Л. Пенрит, В. Губерти, К. Депнер, Х. Луброт. – Ереван: Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций, 2011. – XI, 77 с. – (Служба животноводства и здоровья животных ФАО; N 8).

10 Потоцкий, М. Африканська чума свиней (Pestis africana suum) / М. Потоцкий // Ветеринарна медицина України. – 2008. – № 12. – С. 23–26.

11 Скоупс, Р. Методы очистки белков / Р. Скоупс. – Москва : Мир, 1985. – 358 с.

12 Юбхашини, Э. Африканская чума свиней в Республике Маврикий: (развернутый реферат дипломной работы выпускницы кафедры ветеринарной патологии Российского Университета Дружбы народов) / Эмритлолл Юбхашини // Ветеринарный консультант. – 2008. – № 22. – С. 10–12.

13 African swine fever / A. R. Spickler, J. A. Roth, J. Lofstedt, J. Galyon // Emerging and Exotic Diseases of Animals / A. R. Spickler, J. A. Roth, J. Lofstedt, J. Galyon. – 4th ed. – 2010. – P. 83–85.

14 African swine fever // Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Vol. 2 / World Organisation for Animal Health. – 7th ed. – 2012. – P. 1067–1079.

15 African swine fever [Electronic resource] // Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. – Mode of access: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.08.01\\_ASF.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.08.01_ASF.pdf). – Title from the screen.

16 Expression, cellular localization and antibody responses of the African swine fever virus genes B602L and K205R / B. Gutierrez-Castaneda, A. L. Reis, A. Corteyn [et al.] // Archives of Virology. – 2008. – Vol. 153. – P. 2303–2306.

17 McKinney, R. M. Fluorescein diacetate as a reference color standard in fluorescent antibody studies / R. M. McKinney, J. T. Spillane, O. W. Pearce // Analytical Biochemistry. – 1964. – Vol. 9. – P. 474–476.

18 Preparation of African swine fever contingency plans / M.-L. Penrith, V. Guberti, K. Depner, J. Lubroth. – Rome: FAO animal production and health, 2009. – XI, 69 p. – (FAO Animal Production and Health: N 8).

19 Recombinant antigen targets for serodiagnosis of African swine fever / C. Gallardo, A. L. Reis, G. Kalema-Zikusoka [et al.] // Clinical and Vaccine Immunology. – 2009. – Vol. 16, N 7. – P. 1012–1020.

20 Sánchez-Vizcaíno J. M. Detección precoz y planes de contingencia para peste porcina africana [Electronic resource] / J. M. Sánchez-Vizcaíno. – Mode of access : <http://www.oie.int/doc/ged/D11830.PDF>. – Title from the screen.

21 Summary of Immediate notifications and Follow-ups – 2014 [Electronic resource]. – Mode of access : [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Immsummary](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Immsummary). – Title from the screen.

22 SureLINK™ Fluorescein (FITC) Labeling Kit manual [Electronic resource] / KPL. – Mode of access : <http://www.kpl.com/docs/datasheet/820001.pdf>. – Title from the screen.

23 The T. Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies. I. Experiments on the conditions of conjugation / T. The, T. Feltkamp // Immunology. – 1970. – Vol. 18. – P. 865–873.

**Якубовский М. В.**, доктор ветеринарных наук, профессор  
**Пахноцкая О. П.**, аспирант, магистр ветеринарных наук  
**Зубовская И. В.**, кандидат ветеринарных наук

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского, г. Минск*

## **ВЛИЯНИЕ КРИПТОСПОРИДИОЗА ТЕЛЯТ НА ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ ПРОТИВ КОЛИБАКТЕРИОЗА, САЛЬМОНЕЛЛЕЗА И КЛЕБСИЕЛЛЕЗА**

### **Резюме**

*В результате проведенных исследований установлено, что ослабленный криптоспоридиозной инвазией организм телят не может в полной мере дать иммунологический ответ на введение вакцины. Новый ветеринарный препарат «Янсевит», применяемый при криптоспоридиозе, способствует выработке более напряженного поствакцинального иммунитета против сальмонеллеза, колибактериоза и клебсиеллеза.*

### **Summary**

*In result of studies it is established that calves that are sick cryptosporidiosis are not as able to produce an optimal immune response to vaccine. New veterinary drug "Jansevitum" in criptosporidiosis helps produce more intense post-vaccination immunity against salmonellosis, colibacillosis and klebsielliosis.*

*Поступила в редакцию 19.12.2014 г.*

В настоящее время хорошо известны факты отягощающего влияния паразитов на течение бактериальных и вирусных инфекций. Полученные результаты позволяют считать, что в основе влияния гельминтов на течение инфекционного процесса лежит их способность подавлять защитные реакции хозяина к другим инфицирующим его агентам [2, 3, 4, 6]. Одним из механизмов этой гетерогенной иммуносупрессии может быть феномен конкуренции антигенов, при котором Т-лимфоциты, активизированные антигенами гельминтов, подавляют способность В-лимфоцитов вырабатывать антитела к агентам второго инфекционного начала [7].

Наиболее важным механизмом, установленным лишь в последние годы, является, по-видимому, подавление пролиферации Т- и В-лимфоцитов особыми цитотоксическими веществами, выделяемыми гельминтами [2,3].

Желудочно-кишечные гельминты и эймерии, попадая в организм, мобилизуют его иммунологический ответ на введение антигена. В качестве пластического

материала при этом расходуются белки. Кроме того, половозрелые паразиты и их личинки нарушают целостность слизистой оболочки кишечника, тем самым ухудшают условия всасывания питательных веществ, в том числе и белков. Следовательно, организм инвазированных животных испытывает дефицит в пластическом материале для выработки специфических антител после вакцинации [4].

В литературе имеется много сообщений о том, что гельминты и простейшие обладают депрессивным действием на резистентность и иммунологическую реактивность организма хозяина, осложняют течение инфекционного процесса, тормозят поствакцинальный иммуногенез (И.М. Суслов, 1971; Е.М. Марутян, 1978; А.А. Авакян, 1980; С.И. Петренко, 1981; М.М. Шахмурзов, Д.И. Панасюк, М.А. Сидоров, 1981; Ю.К. Горбов, А.П. Мачинский, 1983; М.В. Якубовский с соавт., 1983; М.А. Ананчиков, 1985; В.П. Якименко, 2003; А.В. Сандул, 2008; и др.).

В связи с изложенным очевидно, что профилактика инфекционных заболеваний должна быть тесно связана с организацией профилактических мероприятий при паразитозах [2, 3, 4, 6].

Эпизоотическая ситуация по бактериальным желудочно-кишечным инфекциям телят в Республике Беларусь характеризуется тем, что в их этиологической структуре *Escherichia coli* занимает 50,44 %, *Proteus mirabilis* – 15,04 %, *Klebsiella pneumoniae* – 10,62 %, *Salmonella spp.* – 7,08 %. Но, несмотря на высокую иммуногенность применяемых биопрепаратов и снижение заболеваемости по вышеназванным инфекциям, летальность при колибактериозе с 2003 по 2010 гг. увеличилась на 8,4 %, при сальмонеллезе – на 8,8 %, что отражает несовершенство комплекса профилактических мер [1]. Это можно объяснить наличием ряда факторов, снижающих иммунный ответ на введение вакцины. К таким факторам можно отнести и протозойные заболевания, в частности – криптоспоридиоз.

К сожалению, при проведении массовой вакцинации телят против бактериальных инфекционных заболеваний не принимается во внимание зараженность их протестейшими.

Сообщений об изучении влияния криптоспоридий на иммунитет при бактериальных инфекциях телят в литературе не имеется.

Учитывая важность этих вопросов для профилактики бактериальных желудочно-кишечных инфекций телят, перед нами стала **задача**: изучить влияние криптоспоридий на формирование и напряженность поствакцинального иммунитета против бактериальных инфекций телят.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились в отделе паразитологии, в отделе эпизоотического и иммунологического мониторинга РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» и хозяйствах Минской области Республики Беларусь в зимне-

весенний период. Объектом исследований служили телята 9–12 дневного возраста, спонтанно зараженные криптоспоридиями, и телята, свободные от данных паразитов. На основании копроскопических исследований методом нативного мазка с окраской по Циль-Нильсену (для определения интенсивности криптоспоридиозной инвазии) были сформированы по принципу условных аналогов 3 группы животных: 1-ая опытная – телята, инвазированные криптоспоридиями, которым применяли иммуномодулятор «Янсевит» в дозе 100 мг на кг массы тела животного перорально 1 раз в день в течение пяти дней; 2-я группа – инвазированные животные, которым препарат не задавали; 3-я – интактные телята. Для изучения иммунобиологических показателей телят, инвазированных криптоспоридиями и пролеченных новым отечественным препаратом «Янсевит», отбирали пробы крови до введения препарата и на 7, 14, 21, 28 и 42 дни опыта. Сыворотку крови исследовали на биохимическом анализаторе Dialab Autolyser. С помощью электрофоретической системы SEBIA определяли белковые фракции.

Животных 1, 2 и 3 групп в возрасте 22–25 дней иммунизировали однократно в дозе 1,0 см<sup>3</sup> вакциной инактивированной эмульгированной для профилактики колибактериоза, сальмонеллеза, клебсиеллеза и протеоза крупного рогатого скота (ТУ ВУ 600049853.181-2012, серия №4, контроль №4, изготовлена РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», годна до 11.2014 г.) согласно инструкции по применению. Животным 4 группы (инвазированные криптоспоридиями) препарат не применяли и не вакцинировали. От всех животных отбирали пробы крови до иммунизации и через 7, 14, 28 и 56 дней после иммунизации для последующего серологического исследования на уровень титров специфических антител. Сыворотки крови исследовали в реакции агглютинации (РА) со взвесью каждого штамма *Escherichia coli* «КМИЭВ-98», *Salmonella dublin* «КМИЭВ-В115», *Klebsiella*

*pneumoniae* «КМИЭВ-В106» в рабочем разведении 1,0–1,5 млрд. микробных тел в см<sup>3</sup>.

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью прикладных программ Microsoft Excel.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исходное заражение (интенсивность инвазии) у опытных телят криптоспоридиями составляла  $2128,36 \pm 308,55$  тыс. ооцист криптоспоридий в 1 г фекалий. Первым выраженным симптомом болезни была водянистая диарея, которая свидетельствует о задержании воды в просвете кишечника. Температура тела животных оставалась в пределах физиологической нормы. С развитием патологического процесса наблюдали угнетенное состояние, прогрессирующее исхудание и обезвоживание организма, профузную диарею с прожилками крови. На 2 день после проведенного курса лечения у 40 % животных первой опытной группы в мазках фекалий обнаружили

единичные ооцисты криптоспоридий, у всех телят отсутствовали признаки угнетения и расстройства со стороны желудочно-кишечного тракта. Интенсивность применения янсевида с лечебной целью при криптоспоридиозе телят составила 95,57 %.

Нарушения иммунологических реакций могут вызываться избытком или недостатком белка, отдельных аминокислот, компонентов липидного обмена, витаминов, макро- или микроэлементов. При плохом усвоении белка происходит нарушение клеточной пролиферации лимфоидных органов организма животных с последующей их атрофией. Клетки лимфоидных органов при дефиците белков задерживаются в развитии на первых этапах митотического цикла. Это проявляется появлением незрелых лимфоцитов или Т-лимфоцитов и торможением образования антител, что обуславливается изменением конформационной структуры иммуноглобулиновых рецепторов В-лимфоцитов [8].

Таблица 1 – Динамика содержания общего белка в сыворотке крови телят, г/л ( $M \pm m, P$ )

Дни опыта	Группы телят		
	инвазированные + курс янсевида	инвазированные	интактные
до применения препаратов	$66,61 \pm 0,97^*$	$64,67 \pm 1,34$	$61,99 \pm 1,51$
7	$62,64 \pm 2,15^{**}$	$53,23 \pm 1,43$	$63,09 \pm 2,04^{**}$
14 (день вакцинации)	$64,20 \pm 1,65^{**}$	$54,09 \pm 2,21$	$64,33 \pm 1,85^{**}$
21 (7)	$64,81 \pm 0,85^*$	$58,78 \pm 1,73$	$66,54 \pm 1,65^*$
28 (14)	$67,07 \pm 2,00^*$	$57,70 \pm 2,25$	$68,75 \pm 1,81^{**}$
42 (28)	$66,77 \pm 1,62^*$	$63,21 \pm 2,81$	$67,48 \pm 2,28^*$

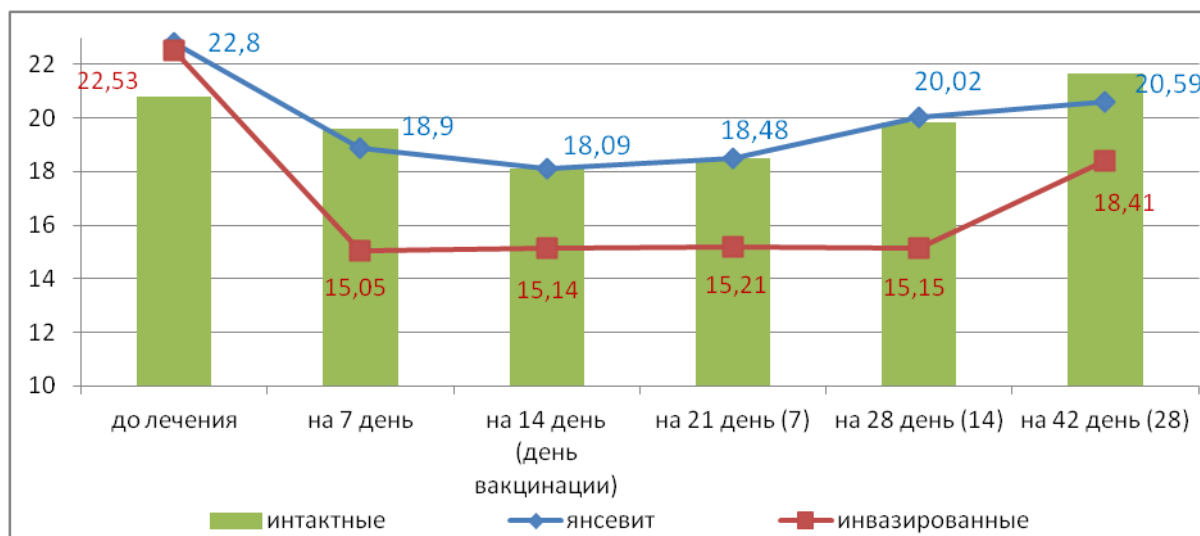
Примечание – \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  к группе «инвазированных животных», в скобках указаны дни после вакцинации

Содержание общего белка в сыворотке крови до начала опыта у инвазированных телят было достоверно выше на 7,5 % ( $P < 0,05$ ), чем у интактных телят (таблица 1). Возможно, что в первые дни заболевания гиперпротеинемия имеет относительный характер как следствие сгущения крови при диарее [5]. Начиная с 7-го дня наблюдения содержание общего белка в сыворотке крови у этих телят было достоверно ниже в сравнении с показателями

свободных от паразитов телят. Эти изменения указывают на нарушение белкового обмена, что может быть связано с нарушением функции печени, а также с плохим усвоением протеина вследствие нарушения ферментативной деятельности кишечника и процессов всасывания. С развитием патологического процесса в результате патогенного действия шизонтов и гамонтов криптоспоридий энтероциты кишечника подвергаются дегенеративным изменениям,

с последующей атрофией ворсинок. Также значительные потери белка обусловлены потерей его через желудочно-кишечный тракт. На 14-й день наблюдения (день вакцинации животных) были зафиксированы

достоверно низкие показатели содержания общего белка в сыворотке крови, что в 1,19 раза ( $P < 0,001$ ) ниже показателей у интактных телят (контрольной группы).



Примечание – в скобках указаны дни после вакцинации

Рисунок 1 – Динамика содержания г-глобулинов в сыворотке крови телят, %

Фракция г-глобулинов состоит из иммуноглобулинов, функционально представляющих собой антитела, обеспечивающие гуморальную иммунную защиту организма от инфекций и чужеродных веществ. Нами отмечено резкое снижение уровня г-глобулинов у больных животных (2 группа) на 7-й день опыта, что в 1,31 раза ( $P < 0,05$ ) ниже показателей группы интактных телят. Также достоверно низкие показатели г-глобулинов у этих телят отмечались с 21 по 42 дни наблюдения и составляли  $15,21 \pm 1,02$  % –  $18,41 \pm 0,82$  % против  $18,51 \pm 0,71$  % –  $21,65 \pm 1,11$  % у телят 3 группы.

Следует отметить, что к 14 дню опыта в группе телят, которым задавали янсеvit, количество общего белка увеличилось на 18,7 % ( $P < 0,01$ ) по сравнению к инвазированными животными и достигало уровня интактных телят. Уровень г-глобулинов приблизился к показателям контрольных телят к 14 дню эксперимента, а достоверное увеличение по сравнению с инвазированными животными отмечено на 7 и 28 дни наблюдения на 25,6 % ( $P < 0,05$ ) и на 32,1 % ( $P < 0,01$ ) соответственно.

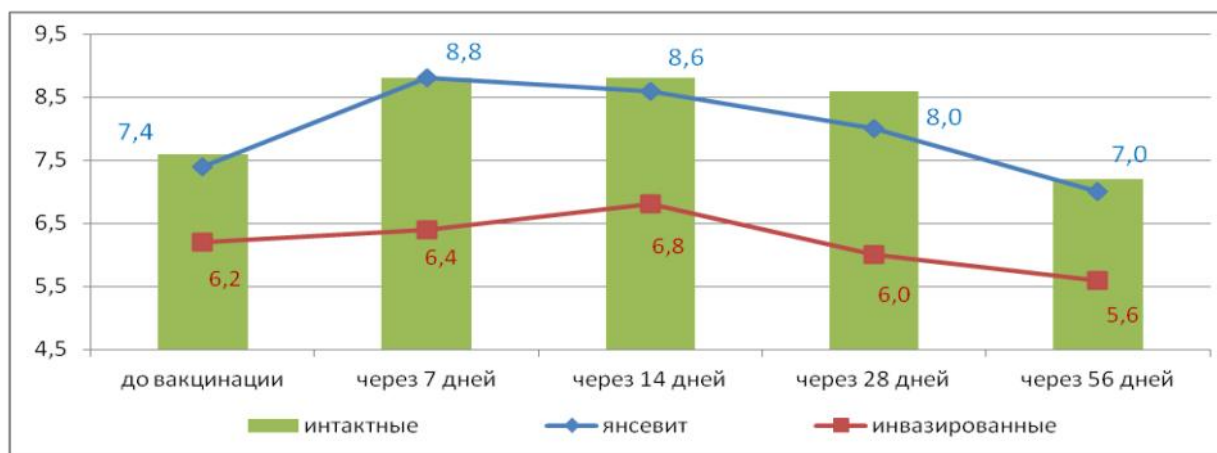
Полученные данные говорят о том, что криптоспориديоз проявляется нарушением белкового обмена и дефицитом иммунологически активных белков, что, в свою очередь, приводит к снижению иммунореактивности. Это подтверждается результатами наших дальнейших исследований.

Иммунизация телят в возрасте 22 – 25 дней вакциной инактивированной эмульгированной для профилактики колибактериоза, сальмонеллеза, клебсиеллеза и протеоза крупного рогатого скота стимулировала иммунологическую перестройку в организме животных. Уже на 7-й день после иммунизации титр специфических антител к антигенам *Salmonella dublin*, *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* F41 в группе телят, которым задавали иммуностимулирующий препарат «Янсеvit», возрос до  $5,2 \pm 0,37$  –  $8,8 \pm 0,37 \log_2$ , в группе инвазированных телят – до  $3,4 \pm 0,40$  –  $6,4 \pm 0,51 \log_2$ , а в контрольной –  $5,4 \pm 0,60$  –  $8,8 \pm 0,73 \log_2$ . Таким образом, в организме условно здоровых телят и телят, подвергнутых лечению, вакцина вызывает

высокую выработку антител по сравнению с телятами, инвазированными криптоспоридиями.

гуморального иммунитета у телят к антигенам кишечной палочки, сальмонеллы, клебсиеллы представлены на рисунках 2, 3, 4.

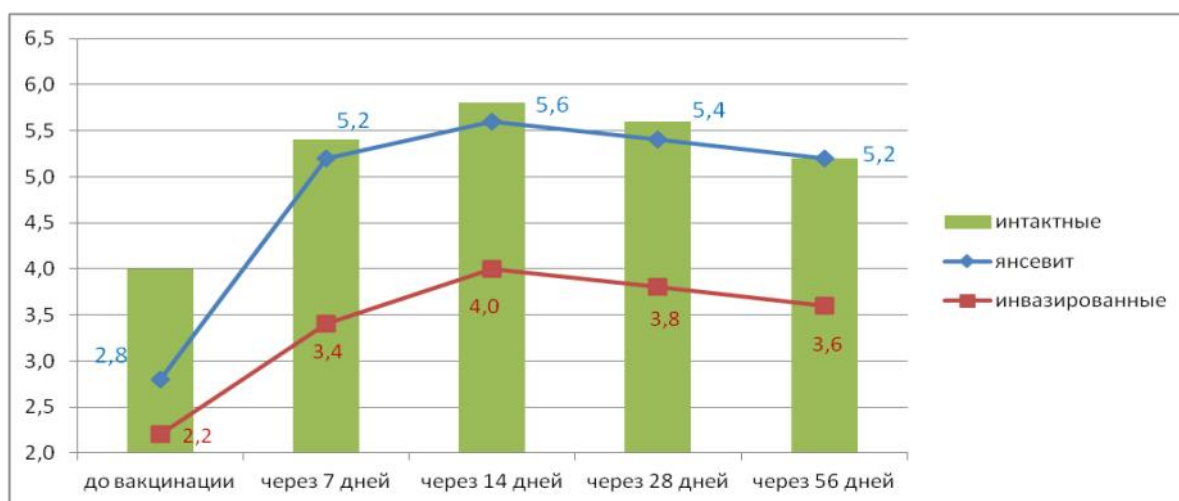
Результаты изучения напряженности



**Рисунок 2 – Динамика образования титра антител к бактериальному антигену *Escherichia coli* F41 в крови телят, иммунизированных вакциной инактивированной эмульгированной для профилактики колибактериоза, сальмонеллеза, клебсиеллеза и протеоза,  $\log_2$**

Как видно на диаграмме, титр специфических антител к антигену *Escherichia coli* F41 у контрольных неинвазированных телят был на протяжении опыта на достаточно высоком уровне и составлял  $8,8 \pm 0,73 - 7,2 \pm 0,37 \log_2$ . У инвазированных телят отмечали наименьшее содержание специфических антител, титр которых был достоверно ниже на  $2,4 \log_2$  ( $P < 0,05$ ) –

$1,6 \log_2$  ( $P < 0,01$ ), чем у контрольных интактных телят. В группе телят после применения янсеита наивысшая выработка антител отмечена на 7-й день после вакцинации ( $8,8 \pm 0,37 \log_2$ ), титр которых был на уровне интактных контрольных животных и выше на  $2,4 \log_2$  ( $P < 0,01$ ), чем у инвазированных телят.

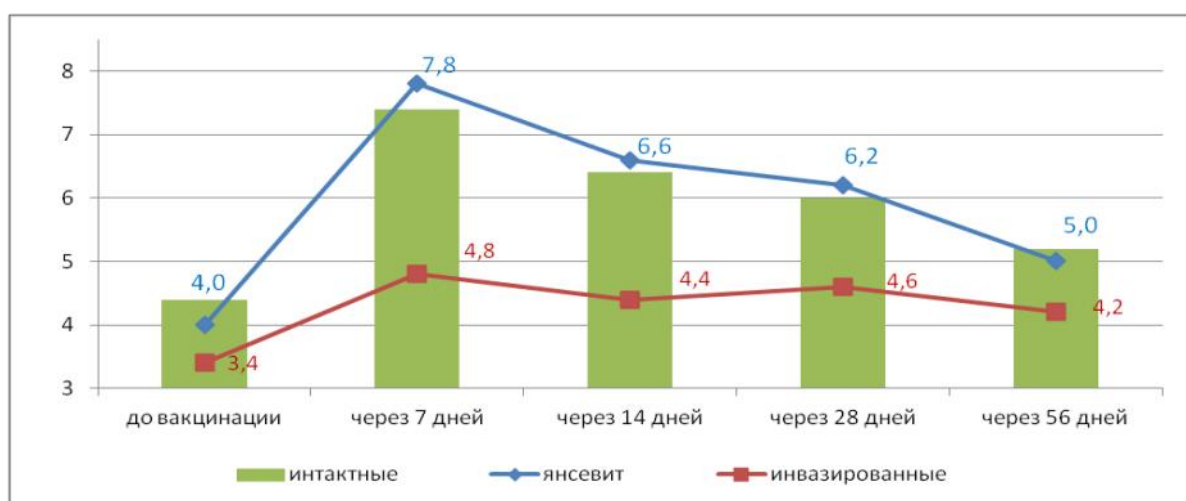


**Рисунок 3 – Динамика антителогенеза к бактериальному антигену *Salmonella dublin* в крови телят, иммунизированных вакциной инактивированной эмульгированной для профилактики колибактериоза, сальмонеллеза, клебсиеллеза и протеоза,  $\log_2$**

При оценке уровня выработки антител к бактериальному антигену *Salmonella dublin* при введении вакцины наиболее высокие показатели установлены в сыворотке крови телят, вакцинированных против этого заболевания, но не подвергавшихся заражению криптоспоридиями (рисунок 3). Так, на 14-й день после вакцинации уровень специфических антител у этих животных составлял  $5,8 \pm 0,73 \log_2$ . У животных, инвазированных на момент вакцинации, титр антител на 14-й день был на уровне  $4,0 \pm 0,32 \log_2$ , что на  $1,8 \log_2$  ( $P < 0,05$ ) меньше, чем у контрольных; у переболевших и вакцинированных телят после применения янсевита титр противосальмонеллезных

антител составлял  $5,6 \pm 0,24 \log_2$ . К концу опыта у животных, которым задавали янсевит, титр специфических антител составлял  $5,2 \pm 0,37 \log_2$ , в то время как у инвазированных телят, которым препарат не применяли, был достоверно ниже на  $1,6 \log_2$  ( $P < 0,05$ ).

Анализируя динамику иммуногегеза к бактериальному антигену *Klebsiella pneumoniae* в крови телят (рисунок 4), нами отмечено, что вакцина вызывает высокую выработку антител в организме интактных телят ( $7,4 \pm 0,51 \log_2 - 5,2 \pm 0,58 \log_2$ ) по сравнению с уровнем антител у ослабленных инвазированных животных.



**Рисунок 4 – Динамика образования титра антител к бактериальному антигену *Klebsiella pneumoniae* в крови телят, иммунизированных вакциной инактивированной эмульгированной для профилактики колибактериоза, сальмонеллеза, клебсиеллеза и протеоза,  $\log_2$**

На 14-й день титр антигемагглютининов у инвазированных криптоспоридиями телят составлял  $4,4 \pm 0,40 \log_2$ , что на  $2,0 \log_2$  ниже ( $P < 0,05$ ), чем в контроле (интактные) и на  $2,2 \log_2$  ниже ( $P < 0,05$ ) у телят, подвергнутых лечению. В группе телят, которым задавали иммуностимулирующий препарат в качестве патогенетической терапии криптоспоридиозной инвазии, на 7–28-е сутки отмечен наибольший уровень выработки антител к антигену *Klebsiella pneumoniae* –  $7,8 \pm 0,58 - 6,2 \pm 0,66 \log_2$ .

Следует отметить, что в сыворотке крови животных четвертой группы

(инвазированные неиммунизированные) титры антител за период исследования снижались к антигену *Escherichia coli* F41 от  $5,75 \pm 0,48 \log_2$  и до  $3,75 \pm 0,48 \log_2$ , к *Salmonella Dublin* –  $3,0 \pm 0,41 - 1,75 \pm 0,48 \log_2$ , к *Klebsiella pneumoniae* –  $4,0 \pm 0,41 - 2,75 \pm 0,25 \log_2$ , что указывает на наличие колострального иммунитета и постепенное снижение его напряженности к концу опыта.

Полученные результаты позволяют считать, что ослабленный паразитарной инвазией организм животного не может в полной мере дать иммунологический ответ на введение бактериальных антигенов, так как

вакцинация проводится на фоне иммунодепрессивного действия криптоспоридий и нехватки пластического материала для выработки высокого уровня антител. Новый отечественный ветеринарный препарат в качестве патогенетической терапии при криптоспоридиозе способствует выработке более напряженного поствакцинального иммунитета против колибактериоза, сальмонеллеза и клебсиеллеза. В системе мер борьбы и профилактики необходимо учитывать иммунодефицитное состояние телят, а вакцинопрофилактику нужно проводить с учетом результатов иммуномониторинга.

### ВЫВОДЫ

1 У животных, инвазированных криптоспоридиями, после иммунизации вакциной инактивированной эмульгированной для профилактики колибактериоза, сальмо-

неллеза, клебсиеллеза и протеоза крупного рогатого скота титр антигемагглютининов ниже к *Escherichia coli* на 22,2 – 30,2 %, к *Salmonella dublin* – на 30,8 – 37,0 %, к *Klebsiella pneumoniae* – на 19,2 – 35,1 %, чем у интактных телят. Таким образом, криптоспоридии препятствуют созданию напряженного гуморального иммунитета при бактериальных инфекциях.

2 Применение нового отечественного иммуностимулирующего препарата «Янсевит» при криптоспоридиозе способствует формированию более напряженного иммунитета против колибактериоза, сальмонеллеза и клебсиеллеза. Так, специфические титры антител к антигенам *E. coli* выше на 20,0 – 27,3 %, к *Salmonella dublin* – на 28,6 – 34,6 %, к *Klebsiella pneumoniae* – на 19,2 – 38,5 %, чем у инвазированных животных, препарат которым не применяли.

### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Опарина, И. В. Специфическая профилактика колибактериоза, сальмонеллеза и протеоза крупного рогатого скота: дис. ... канд. ветер. наук: 06.02.02 / И.В. Опарина. – Минск, 2012. – 137 с.
- 2 Панасюк, Д.И. Проблемы ассоциации гельминтов, патогенных простейших и микрофлоры при интенсивном ведении животноводства / Д.И. Панасюк, В.В. Филиппов, П.В. Радионов – М., 1978. – 52 с.
- 3 Петренко, С.И. Влияние кишечных паразитов и дегельминтизации на иммунитет против пастереллеза свиней: автореф. дис.... канд. ветер наук: 03.00.19/ С.И. Петренко, Минск 1981. – 19с.
- 4 Свиридова, А.П. Влияние паразитов желудочно-кишечного тракта на формирование иммунитета при парагриппе-3 у молодняка крупного рогатого скота: дис. ... канд. ветер наук: 16.00.03 / А.П. Свиридова. – Минск, 1990. – 217 с.
- 5 Шевченко, О.П. Электрофорез в клинической лаборатории. 1. Белки сыворотки крови / О.П. Шевченко, В.В. Долгов, Г.А. Олефиренко. – М.: Реафарм, 2006. – 160 с.
- 6 Якубовский, М.В. Влияние паразитозов свиней на поствакцинальный иммунитет против рожи и болезни Ауески/ М.В. Якубовский, В.Г. Сакович // Ветеринарная наука – производству / Труды БелНИИЭВ.– Минск: Ураджай, 1983.– Вып. 20.– С. 70 – 75.
- 7 Roth, J.A. Challenges and Opportunities for Inducing Immunity in Calves / [Электронный ресурс]. – 2014. – Режим доступа: [http://c.ymcdn.com/sites/www.iowavma.org/resource/resmgr/imported/Roth\\_Immunity\\_in\\_Calves.pdf](http://c.ymcdn.com/sites/www.iowavma.org/resource/resmgr/imported/Roth_Immunity_in_Calves.pdf) – Дата доступа: 09.12.2014
- 8 Scrimshaw, N.S. Interactions of nutrition and infection/ N.S. Scrimshaw. – Geneva, 1968. – P.60–142.

Плотницкий Д.С., магистрант\*

Федотов Д.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент\*

Кучинский М.П., доктор ветеринарных наук, доцент

Орда М.С., соискатель\*

\*УО «Витебска ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск

## ПОСТИНКУБАЦИОННЫЙ МОРФОГЕНЕЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПЕРЕПЕЛОВ

### Резюме

В работе описано строение и особенности возрастной морфологической перестройки поджелудочной железы у самцов японских перепелов, выращиваемых на промышленной основе в условиях птицефабрики. Впервые в морфогенезе поджелудочной железы петухов перепела определены четыре периода. Установлено, что морфофункциональная активность структур поджелудочных желез из всех возрастных периодов перепела наибольшая в период половой зрелости (35 сутки).

### Summary

In the thesis the structure and features related age of the morphological reconstruction of the pancreas in male Japanese quail grown on an industrial scale in a poultry farm are described. For the first time in the morphogenesis of the pancreas of the roosters quail are identified four periods. It is established that the morpho-functional activity of the pancreatis structures from all age periods of quail is greatest at puberty (35th day).

Поступила в редакцию 12.11.2014 г.

### ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в республике все больше уделяется внимание развитию птицеводства, поэтому постановлением Совета Министров Республики Беларусь (28 сентября 2010 г. № 1395) утверждена Программа развития птицеводства в Республике Беларусь в 2011–2015 годах. Современное птицеводство основано на промышленных методах производства продукции. При этом весь технологический процесс направлен на решение задач повышения продуктивности птицы, увеличение валового производства и улучшение качества получаемой продукции.

Птицеводство – одна из эффективнейших отраслей сельского хозяйства, не имеющая сезонности. Вместе с тем, интенсивные технологии выращивания и большая концентрация поголовья являются основными причинами снижения жизнеспособности молодняка птицы, увеличения

заболеваемости и летальности. В последние годы для интенсификации птицеводства разработаны различные способы коррекции защитных сил организма птиц как при физиологических, так и при патологических состояниях.

Перепел является самым мелким и скороспелым представителем одомашненных куриных, а его яичная и мясная продукция обладает отменными диетическими качествами, отличается гипоаллергенностью, экологической безопасностью и пользуется возрастающим спросом потребителей. Необходимость интенсификации перепеловодства требует постоянного углубления знаний о закономерностях морфологической организации систем организма животных, обеспечивающих их основные жизненные явления.

Обменные процессы и пищеварение в организме перепелов во многом поддерживает поджелудочная железа – орган,

выполняющий одновременно экзокринную и эндокринную функции. Точное знание гистологической структуры поджелудочной железы, функциональной активности ее основных компонентов позволяет видеть глубинные процессы, происходящие на клеточном уровне, необходимые при проведении различных лечебных и профилактических мероприятий, при изменении технологических параметров содержания.

**Цель исследований** – изучить постинкубационный морфогенез поджелудочной железы у петухов японских перепелов.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Работа выполнялась на кафедрах зоологии, патологической анатомии и гистологии УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины». Материал для исследования отбирался от самцов японских перепелов, выращиваемых на промышленной основе в условиях ОАО «Птицефабрика Городок». Для изучения возрастных перестроек были подобраны физиологически обоснованные возрастные группы птицы (по 4 особи в каждой): суточные – период вылупления, 15-суточные – период завершения линьки, 35-суточные – период половой зрелости (птица прошла линьку, способна к различному кормлению), 45-суточные – период физиологической или истинной зрелости, 55-суточные – продуктивный период (завершающий этап выращивания).

Для морфологических исследований во все изучаемые возрастные периоды от птиц отбирали поджелудочную железу и фиксировали в смеси Ружа. Затем морфологический материал подвергали уплотнению путем заливки в парафин по общепринятым методикам. Изготавливали гистологические срезы толщиной 3 – 5 – 7 мкм на санном МС-2 микротоме с последующей окраской гематоксилин-эозином. На светооптическом уровне каждая цитологическая структура описывалась набором морфологиче-

ских признаков, отражающих видоспецифические и возрастные функциональные особенности исследуемой железы.

Абсолютные измерения структурных компонентов поджелудочной железы осуществляли при помощи светового микроскопа «Olympus» с использованием программы «Cell^A» и проводили фотографирование цветных изображений. Все цифровые данные, полученные при проведении экспериментальных исследований, были обработаны с помощью компьютерного программного профессионального статистического пакета «IBM SPSS Statistics 21».

### **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

У японских перепелов поджелудочная железа является полиморфным органом, лежащим позади правой доли печени в каудо-вентральном направлении между восходящим и нисходящим коленами двенадцатиперстной кишки на всем ее протяжении. С возрастом топография поджелудочной железы у перепелов не изменяется. У птенцов поджелудочная железа светло-розового цвета, лентовидной формы и упругой консистенции, а к 55-м суткам орган приобретает желтовато-розовый цвет.

Установлено, что абсолютная масса поджелудочной железы у суточных птенцов перепелов составляет  $0,10 \pm 0,01$  г. К 35-суточному возрасту масса железы у птиц увеличивается почти в 2 раза, а с 35 до 55 суток увеличивается ( $p < 0,05$ ) в 2,06 раза (таблица 1). За весь период исследования масса железы увеличивается в 2,5 раза и к 55-суточному возрасту петухов перепела составляет  $0,37 \pm 0,03$  г. У суточной птицы толщина соединительнотканной капсулы поджелудочной железы равна  $12,08 \pm 0,67$  мкм. К 15 суткам данный показатель увеличивается в 1,55 раза ( $p < 0,05$ ), к 35 суткам – в 1,21 раза, к 45 суткам – в 1,42 раза ( $p < 0,05$ ) и к 55 суткам – в 1,10 раза. За весь период исследования с 1 по 55-е сутки толщина капсулы железы увеличилась в 2,92 раза.

Таблица 1 – Морфологические параметры поджелудочной железы перепелов

Возраст, сут.	Абсолютная масса, г	Толщина капсулы, мкм	Относительное содержание стромы, %	Относительное содержание паренхимы, %	Размер ацинусов, мкм	Количество ацинусов в поле зрения, шт.
1	0,10±0,01	12,08±0,67	12,50±2,08	85,00±3,56	14,75±0,49	42,25±3,40
15	0,12±0,02	18,73±0,35*	15,25±0,50	84,75±0,50	20,75±0,65*	75,00±3,92*
35	0,18±0,01*	22,70±0,69	17,52±2,22	82,75±2,22	26,75±0,73	171,00±2,58**
45	0,25±0,02	32,20±0,34*	30,00±0,82*	70,00±0,82*	22,45±0,34	150,00±2,59
55	0,37±0,03*	35,28±0,40	38,00±2,31	62,00±2,31*	14,98±0,43*	99,50±4,65*

Примечание – \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  по отношению к предыдущей возрастной группе птиц

Экзокринная часть поджелудочной железы представлена концевыми секреторными отделами, называемыми ацинусами, и системой выводных протоков, ведущая роль среди которых принадлежит междольковым и общим. Ацинусы имеют у перепелов трубчато-альвеолярную форму. Их стенка сформирована однослойным кубическим эпителием – ациноцитами. От степени морфофункциональной зрелости ациноцитов и зависит уровень функциональной активности железы, сопряженный с основными физиологическими процессами, которые характеризуют определенные периоды постнатального онтогенеза птицы.

Рост ацинусов поджелудочной железы в постовариальном онтогенезе перепела имеет определенную закономерность. Интенсивный рост концевых секреторных отделов приходится на первый месяц развития (с  $14,75 \pm 0,49$  мкм до  $26,75 \pm 0,73$  мкм), а затем спад роста (с  $26,75 \pm 0,73$  мкм до  $14,98 \pm 0,43$ ). К 15 суткам данный показатель увеличивается в 1,41 раза ( $p < 0,05$ ), к 35 суткам – в 1,29 раза, к 45 суткам размер ацинусов снижается в 1,19 раза и к 55 суткам – в 1,50 раза ( $p < 0,05$ ). Следовательно, за первый месяц развития перепелов (1 – 35 суток) размер ацинусов поджелудочной железы увеличивается в 1,81 раза. У 35 суточных перепелов поджелудочная железа имеет уже сложившуюся структурно-композиционную организацию, способную

обеспечить адаптацию организма к новым условиям существования и питания, поэтому в данном возрасте ацинусы имеют максимальный размер. Последующие сроки морфогенеза характеризуются глубокой динамикой становления органных структур, в основе которой лежат тесно взаимосвязанные между собой процессы роста и дифференцировки ациноцитов.

Достаточно демонстративными, в полной мере отражающими динамику возрастных изменений и функциональной активности ациноцитов, являются и полученные нами показатели относительного содержания элементов стромы и паренхимы в поджелудочной железе перепелов. С возрастом содержание в органе стромы увеличивается в 3,04 раза, а паренхимы уменьшается в 1,37 раза. Такое быстрое разрастание соединительнотканых трабекул, межацинарных прослоек и приводит к уменьшению размеров ацинусов. С изменением размеров ацинуса изменяется и их количество в поле зрения микроскопа. В железах суточных цыплят перепелов их содержание минимальное –  $42,25 \pm 3,40$  шт. После линьки (15 суток) количество ацинусов возрастает в 1,78 раза ( $p < 0,05$ ), а к 35-суточному возрасту – в 2,28 раза ( $p < 0,01$ ). Затем количество ацинусов плавно снижается и к 55-суточному возрасту перепелов составляет  $99,50 \pm 4,65$  шт. ( $p < 0,05$ ).

Паренхима экзокринного отдела поджелудочной железы включает также и выводные протоки, которые располагаются в такой последовательности: вставочный проток → межацинозный проток → внутридольковый проток → междольковый проток → общий выводной проток. Межацинозные и внутридольковые протоки выстланы кубическим эпителием, а в междольковых протоках он становится цилиндрическим. Снаружи от эпителия лежит собственная пластинка из рыхлой соединительной ткани. Междольковые выводные протоки располагаются в междольковых прослойках соединительной ткани, они имеют вытянутую форму и узкий просвет, крупные общие протоки – округлую форму и большой звездчатообразный просвет.

Наибольшим изменениям поджелудочная железа перепелов подвергается к 55-суточному возрасту – периоду физиологической или истинной зрелости. В этот период железа начинает подвергаться инволютивным процессам, т.к. у 35-суточных особей она имеет морфологически завершенное дефинитивное строение. К 55-м суткам снижается содержание паренхиматозных элементов, уменьшаются размеры ацинусов за счет увеличения стромальных элементов железы.

Эндокринный отдел поджелудочной железы перепелов сформирован инсулоци-

тами, которые формируют островки Лангерганса. В-инсулоциты формируют островки Лангерганса, а А-эндокриноциты лежат группами до 6 единиц в прослойках рыхлой соединительной ткани по периферии ацинусов и вблизи кровеносных сосудов. Панкреатические островки бессистемно располагаются между ацинусами. Они имеют различную форму, чаще округлую, окружены небольшой прослойкой соединительной ткани и пронизаны сетью синусоидных капилляров.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В морфогенезе поджелудочной железы пегухов перепела нами определены четыре периода: I – формирования и интенсивного роста – 1 – 35-е сутки; II – оптимальной морфологической дифференциации структурных элементов – 35 – 45-е сутки; III – увеличения абсолютной массы органа (за счет разрастания стромальных компонентов), замедления скорости роста экзокринного отдела – 45 – 55-е сутки; IV – неполная инволюция железы – 55-е сутки. В периоды вывода и линьки (1 – 15 суток) перепелов морфофункциональная активность структур поджелудочной железы из всех возрастных периодов наименьшая, а в период половой зрелости (35 сутки) птиц – наибольшая.

### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Биологические основы и технология выращивания перепелов: монография / А.М. Субботин, Д.Н. Федотов, М.С. Орда, М.П. Кучинский, Е.А. Жвилова. – Витебск: ВГАВМ, 2014. – 152 с.
- 2 Жвилова, Е.А. Постинкубационный морфогенез семенников у японских перепелов / Е.А. Жвилова, Д.Н. Федотов, М.П. Кучинский // Аграрная наука – сельскому хозяйству: сборник статей IX Международной научно-практической конференции; в 3 кн., Барнаул, 5 – 6 февраля 2014 г. / ФГОУ ВПО АГАУ. – Барнаул: РИО АГАУ, 2014. – Кн. 3. – С. 271–272.
- 3 Иванова, Р.Н. Влияние пробиотика биоспорина на рост, развитие и продуктивность молодняка перепелов / Р.Н. Иванова, Н.К. Кириллов, И.А. Алексеев // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана. – Казань, 2012. – Т. 209. – С.123–128.
- 4 Красовская, Н.А. Ветеринарно-санитарная оценка доброкачественности мяса перепелов / Н.А. Красовская, А.М. Субботин, М.С. Орда // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины». – 2014. – Т. 50, вып. 1, ч. 1. – С. 185–188.
- 5 Сомова, О.В. Цитологические показатели поджелудочной железы кур разного возраста / О.В. Сомова // Инновационные технологии производства и переработки сельскохозяйственной

продукции: материалы Международной научно-практической конференции, Владикавказ, 21–22 декабря 2011 г. / ФГБОУ ВПО «Горский госагроуниверситет». – Владикавказ: Изд-во ФГБОУ ВПО «Горский госагроуниверситет», 2012. – С. 179–180.

6 Субботин, А.М. Закономерности возрастной структурной перестройки тимуса у перепелов, содержащихся на промышленной основе / А.М. Субботин, Д.Н. Федотов, М.С. Орда // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины». – 2012. – Т. 48, вып. 2., ч. 2. – С. 171–173.

7 Сухорукова, О.А. Механизм повышения продуктивности перепелов путем применения экстракта пихты сибирской / О.А. Сухорукова, Н.Я. Костеша // Вестник Томского государственного педагогического университета. – 2010. – №3. – С. 36 – 40.

8 Федотов, Д. Н. Гистология органов пищеварения: учеб.-метод. пособие / Д.Н. Федотов. – Витебск: ВГАВМ, 2013. – 26 с.

9 Федотов, Д.Н. Закономерности возрастной структурной перестройки щитовидной железы у перепелов, содержащихся на промышленной основе / Д.Н. Федотов, М.П. Кучинский // Животноводство и ветеринарная медицина: ежеквартальный научно-практический журнал. – 2013. – № 2 (29). – С. 49–51.

10 Федотов, Д.Н. Микроскопическое строение надпочечников у японского перепела в возрастном аспекте / Д.Н. Федотов // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины». – 2013. – Т. 49, вып. 2, ч. 1. – С. 154–158.

11 Федотов, Д.Н. Закономерности роста эндокринных желез и органов гомеостатического обеспечения у перепелов в постинкубационном онтогенезе / Д.Н. Федотов // Современные достижения ветеринарной медицины и биологии – в сельскохозяйственное производство: Материалы II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки РСФСР и Башкирской АССР, доктора ветеринарных наук, профессора Хамита Валеевича Аюпова, г. Уфа, 21–22 февраля 2014 г. – Уфа: Башкирский ГАУ, 2014. – С. 267–269.

12 Basha, S.H. Age related changes of the adrenal gland in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) / S.H. Basha, T.A. Kannan, G. Ramesh // Tamilnadu J. Veterinary & Animal Sciences. – 2009. – № 5 (September – October). – P. 198–202.



### **Иммуностимулирующий препарат «САПОФОР»**

Применяют с лечебной целью коровам, больным субклиническим маститом, а телятам и пороссятам – для профилактики и лечения пневмоэнтеритов.

Музыка А.А., кандидат сельскохозяйственных наук, доцент  
Голодько И.В., научный сотрудник

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству», г. Жодино

## ЗООГИГИЕНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЕЗИНОВЫХ ПОКРЫТИЙ БОКСОВ ПРИ БЕСПРИВЯЗНОМ СОДЕРЖАНИИ ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ КОРОВ

### Резюме

*Влияние резиновых покрытий при беспривязно-боксовой системе содержания на теплотехнические показатели подстилки и физиологическое состояние высокопродуктивных коров.*

### Summary

*Influence of rubber coatings at Loose-boxed system content on thermotechnical parameters bedding and the physiological condition of highly productive cows.*

*Поступила в редакцию 22.11.2013 г.*

### ВВЕДЕНИЕ

Современный вариант беспривязно-боксовой системы включает в себя преимущества привязного и беспривязного способа содержания коров. Наличие боксов, выполненных с учетом размеров и живой массы животных, дает возможность коровам отдыхать в индивидуальной ячейке столько, сколько им требуется. Но в то же время животное может свободно передвигаться внутри помещения для приема корма и воды или выйти на выгульную площадку при ее наличии. При таком способе содержания важным также является использование качественных подстилочных материалов, которые обеспечивают комфортность лежания высокопродуктивных коров [3, 6].

Вопросы комфортности содержания на реконструированных фермах и промышленных комплексах приобретают в последние годы все большее значение из-за того, что животные с высокой продуктивностью быстро реагируют снижением продуктивности на ухудшение условий содержания, особенно при интенсивной технологии производства молока [1–3, 5].

**Целью** наших исследований явилось изучение различных подстилочных материалов (резиновых покрытий) импортного и

отечественного производства для индивидуальных боксов, их влияние на теплотехнические показатели мест для лежания и клинические показатели коров при беспривязно-боксовой системе содержания.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в условиях РДУП по племенному делу «Жодино АгроПлемЭлита» Смолевичского района. Для научно-хозяйственного опыта были отобраны три группы коров по принципу аналогов в количестве 10 голов в каждой группе с учетом возраста, живой массы, продуктивности. Содержание животных – групповое, беспривязное, с отдыхом в боксах на резиновых покрытиях. Коровник состоит из 6 рядов боксов с одним кормовым столом, размещенным в центре. Опытных животных разместили в трех изолированных секциях. Контрольную группу животных содержали в секции, где в качестве покрытий для боксов использовали импортные резиновые покрытия «Крайбург». В качестве опытных напольных покрытий для боксов использовали резиновые покрытия отечественного производства «Белшина» и «Экопол».

В научно-хозяйственном опыте изучали следующие показатели:

– интенсивность теплопоглощения резиновыми ковриками измеряли через 1, 30 и 60 минут после лежания животного в месте соприкосновения тела с поверхностью покрытия с помощью бесконтактного пирометра Нимбус-420;

– интенсивность теплоотдачи коврика определяли по измерению температуры поверхности покрытия с помощью тепловизионной камеры Flir-II40 через 1, 30 и 60 минут после подъема животного;

– температуру поверхности кожи коров определяли в двух точках: на животе и в области последнего межреберного промежутка один раз в течение четырех смежных дней каждого месяца с помощью бес-

контактного пирометра Нимбус-420;

Полученные результаты были обработаны методом вариационной статистики на персональном компьютере с использованием пакета статистики Microsoft Excel. Статистическая обработка результатов опыта была проведена по методу Стьюдента. Вероятность различий считалась достоверной при  $P \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Теплообмен животного с окружающей средой и конструкциями, в частности с поверхностью пола животноводческих помещений, является важным фактором, оказывающим непосредственное воздействие на животных (таблица 1) [1, 4, 5].

Таблица 1 – Динамика интенсивности теплопоглощения резиновыми покрытиями в летний период, °С

Интервал измерений	Группы животных		
	I-контрольная	II-опытная	III-опытная
Период исследований	июнь		
через 1 мин	23,3±0,11	23,4±0,10	23,2±0,12
через 30 мин	25,1±0,13	25,3±0,11	25,2±0,09
через 60 мин	26,2±0,16	26,5±0,08	26,1±0,12
Период исследований	июль		
через 1 мин	26,3±0,08	26,4±0,12	26,3±0,10
через 30 мин	27,6±0,14	27,5±0,07	27,7±0,08
через 60 мин	28,7±0,11	28,9±0,09	28,8±0,13
Период исследований	август		
через 1 мин	22,0±0,13	22,1±0,11	22,2±0,14
через 30 мин	23,5±0,12	23,6±0,08	23,4±0,11
через 60 мин	24,8±0,14	24,9±0,13	24,7±0,15

Теплотехнические исследования температурных показателей под лежащими животными, проведенные в летний период при круглогодичном беспривязно-боксовом содержании, свидетельствовали о том, что монолитные резиновые покрытия в II и III опытных группах обладали хорошими тепловыми свойствами и не уступали импортным аналогам I контрольной группы. Так, температура поверхностей импортных покрытий через 1 час лежания животных повышалась в июне на 2,9<sup>0</sup>С или 12,4%, в июле – на 2,4<sup>0</sup>С или 9,1%, а в августе – на

2,8<sup>0</sup>С или 12,7%. Температуры поверхностей отечественного производства покрытий II и III опытных групп повышались на 3,1; 2,5; 2,8 и 2,9; 2,5; 2,5<sup>0</sup>С соответственно.

По мнению Леткевича И.Ф. (1984) особую роль необходимо отводить полам, поскольку животные во время нахождения в помещении непосредственно соприкасаются с ними [4]. Результаты исследований температурных показателей резиновых покрытий в зимний период представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Динамика показателей температуры покрытий в зимний сезон, °С

Интервал измерений	Группы животных		
	I-контрольная	II-опытная	III-опытная
Период исследований	декабрь		
через 1 мин	11,9±0,12	11,8±0,11	11,6±0,14
через 30 мин	17,2±0,11	17,3±0,10	16,9±0,13
через 60 мин	20,6±0,14	20,8±0,11	20,5±0,09
Период исследований	январь		
через 1 мин	10,5±0,11	10,6±0,09	10,3±0,12
через 30 мин	16,3±0,12	16,4±0,10	16,1±0,09
через 60 мин	19,8±0,08	20,0±0,12	19,7±0,14
Период исследований	февраль		
через 1 мин	9,8±0,10	9,9±0,12	9,7±0,11
через 30 мин	15,7±0,13	15,6±0,10	15,8±0,08
через 60 мин	18,7±0,11	18,9±0,14	18,5±0,13

При определении интенсивности теплопоглощения опытных и контрольных покрытий установлено, что они нагревались равномерно. Так, температура контрольного резинового покрытия в зимний период через 1 минуту контакта с телом животных составила 11,9; 10,5 и 9,8°С соответственно в декабре, январе и феврале. В опытных группах высоких колебаний температурных показателей не отмечено, температура находилась в следующих границах: в II и III группах температура в декабре равнялась 11,8 и 11,6°С, в январе и феврале соответственно 10,6 и 10,3°С, 9,9 и 9,7°С. При контакте через час под лежащими животными температура контрольных покрытий в декабре равнялась 20,6°С, в январе –

19,8°С, в феврале – 18,7°С. В II и III опытных группах температура покрытий равнялась в декабре – 20,8 и 20,5°С, в январе – 20,0 и 19,7°С, в феврале – 18,9 и 18,5°С. Достоверной разницы в температурном балансе контрольных и опытных покрытий не установлено.

Одним из важных факторов окружающей среды животноводческих помещений при интенсивной технологии производства молока в условиях круглогодичного беспривязного содержания, когда животных используют в так называемой «жесткой среде» промышленных комплексов, является пол, поскольку животные постоянно находятся с ним в контакте (таблица 3) [5].

Таблица 3 – Динамика теплоохлаждения исследуемых резиновых покрытий после вставания животных в летний период, °С

Интервал измерений	Период исследований		
	июнь	июль	август
	I-контрольная		
через 1 мин	26,2±0,12	27,3±0,12	26,4±0,11
через 30 мин	24,7±0,19	26,0±0,11	25,5±0,12
через 60 мин	23,2±0,11	24,5±0,15	23,3±0,14
	II-опытная		
через 1 мин	26,3±0,10	27,5±0,15	26,6±0,10
через 30 мин	25,5±0,13*	26,4±0,07*	26,0±0,11
через 60 мин	24,3±0,12*	25,9±0,17	24,6±0,15*
	III-опытная		
через 1 мин	26,1±0,12	27,2±0,14	26,5±0,13
через 30 мин	24,6±0,15*	26,2±0,11	25,6±0,09
через 60 мин	23,3±0,11*	24,6±0,12	23,5±0,12*

Примечание – \* критерий достоверности  $P \leq 0,05$

Зоогиgienическими измерениями установлено, что в июне температура поверхности исследуемых покрытий сразу после вставания коров находилась в пределах 26,1–26,3°C, то есть достоверных различий не установлено. Температура поверхности покрытий II опытной группы через 30 и 60 мин после вставания животных превышала температуру I контрольных покрытий на 0,8°C или 1,1% ( $P < 0,05$ ). Интенсивность теплоотдачи в III опытной группе имели незначительные температурные колебания по сравнению с контролем. Таким образом, интенсивность теплоотдачи испытуемых покрытий и контроля не имела статистически достоверных различий. В июле температура исследуемых покрытий сразу после вставания животных находилась в пределах 27,2–27,5°C. Температура поверхности резиновых покрытий измеренной через 30 и 60 мин имела тенденцию к снижению. Во II опытной группе она снизилась

на 15,4 ( $P < 0,05$ ) и 42,9% по сравнению с аналогом контрольной группы. В III опытной группе температура поверхностей исследуемых образцов снижалась (через 30 и 60 мин) на 0,2 и 0,1°C менее интенсивно, чем в контроле измерения. В августе месяце температура покрытий отечественного производства II и III опытных групп через 60 мин после подъема животных снизилась на 35,5% ( $P < 0,05$ ) по сравнению с импортными покрытиями контрольной группы.

При выборе покрытий для полов необходимо учитывать такой важный фактор, как процесс терморегуляции организма с окружающей средой в условиях беспривязного содержания [1, 5, 6]. В связи с этим важное значение придается вопросу изучения теплотехнических свойств покрытий, от которых во многом зависят показатели потерь тепла тела животных, затрат кормов на производство продукции (таблица 4).

Таблица 4 – Изменение температурных показателей применяемых резиновых покрытий после вставания животных в зимний период, °C

Интервал измерений	Период исследований		
	декабрь	январь	февраль
	I-контрольная		
через 1 мин	20,3±0,14	19,2±0,10	18,9±0,14
через 30 мин	15,6±0,12	15,9±0,09	15,4±0,10
через 60 мин	8,2±0,13	8,6±0,11	8,5±0,15
	II-опытная		
через 1 мин	20,3±0,09	19,1±0,12	19,0±0,11
через 30 мин	15,8±0,11	16,1±0,08	15,6±0,13
через 60 мин	8,5±0,13	8,7±0,10	8,8±0,12
	III-опытная		
через 1 мин	20,2±0,11	19,0±0,09	18,9±0,11
через 30 мин	15,5±0,12	15,7±0,13	15,3±0,12
через 60 мин	8,1±0,10	8,5±0,08	8,6±0,09

При измерении температурных показателей в зимний период установлено, что температура поверхности контрольных резиновых покрытий в декабре месяце при измерении через 1 минуту равнялась 20,3°C, в опытных группах температура также была в пределах 20,2–20,3°C. При измерении через час в контрольной, II и III опытных группах температура колебалась в рамках

8,1–8,3°C. При измерении температуры в январе установлено, что в течение часа после вставания животных температура контрольных покрытий, а также во II и III опытных группах снижалась с 19,0–19,1°C до 8,4–8,7°C, т.е. на 10,8, 10,4 и 10,5°C соответственно.

В феврале проведенными измерениями температуры резиновых покрытий через

1 минуту после подъема животных не установлено значительных колебаний в охлаждении исследуемых поверхностей. Температура колебалась в пределах 18,9–19,0°C. В течение часа исследуемые покрытия охлаждались до температурных значений 8,5–8,8°C. Достоверных различий не установлено.

Такую же тенденцию изменения температуры поверхностей полов различных типов в своих исследованиях отмечали Леткевич И.Ф. (1984), Плященко С.И. и др. (2008) [4, 5].

Как отмечает Хазанов В.Е. (2011), для того, чтобы бокс позволял корове ложиться и вставать естественным образом с подачей туловища вперед, быть удобным и комфортным, для того, чтобы корова отдыхала лежа не менее 12–14 часов в сутки, необхо-

димо, чтобы пол бокса был чистым, достаточно мягким и теплым, т. е. иметь низкую теплопроводность [2, 6].

Кожа животных обладает наиболее выраженной реакцией на различия в температурных показателях покрытий. Она выполняет множество функций, одна из которых состоит в том, что являясь внешним покровом и главным регулятором внутренней температуры тела, играет важную функцию в тепловом балансе с окружающей средой в коровнике [1, 4, 5].

Поэтому при исследованиях теплообмена между поверхностями резиновых покрытий и кожей опытных животных провели измерения ее температуры в области живота и последнего межреберного промежутка (таблица 5).

Таблица 5 – Поверхностная температура кожи коров при отдыхе на резиновых покрытиях при беспривязно-боксовом содержании в летний период, °С

Период исследований	Место измерения	Группы животных		
		I контрольная	II опытная	III опытная
июнь	область живота	34,8±0,11	34,6±0,09	34,6±0,13
	область последнего межреберного промежутка	33,4±0,13	33,7±0,12	33,6±0,16
июль	область живота	34,6±0,12	34,9±0,14	34,5±0,17
	область последнего межреберного промежутка	33,8±0,15	33,6±0,08	33,9±0,13
август	область живота	35,0±0,14	34,9±0,16	34,7±0,18
	область последнего межреберного промежутка	33,7±0,12	33,8±0,13	33,4±0,11

Об удовлетворительных теплозащитных качествах резиновых покрытий свидетельствуют результаты измерений температуры поверхности кожи опытных животных в летний период. Так, в июне температура в области живота имела незначительные колебания в пределах 34,6–34,8°C и в области последнего межреберного промежутка – 33,4–33,7°C у всех исследуемых животных. В июле температура в области живота находилась в рамках 34,5–34,9°C, в области измерения последнего межреберного промежутка – 33,6–33,9°C. В августе месяце температура, измеренная в области

живота и последнего межреберного промежутка, изменялась в пределах 34,7–35°C и 33,4–33,8°C в опытных группах.

Кожа теплокровных животных представляет собой большое рецепторное поле, приспособленное принимать внешние раздражения с окружающей среды и при изменении условий содержания. Поэтому по степени реакции кожи животных при контакте с полом в определенной степени можно судить о теплозащитных свойствах применяемых покрытий для полов боксов [4]. Результаты измерений отражены в таблице 6.

Таблица 6 – Температура поверхности кожи коров при отдыхе на различных резиновых покрытиях в зимний период, °С

Период исследований	Место измерения	Группы животных		
		I контрольная	II опытная	III опытная
декабрь	область живота	34,3±0,13	34,4±0,10	34,6±0,11
	область последнего межреберного промежутка	33,2±0,12	33,3±0,09	33,1±0,13
январь	область живота	34,2±0,13	34,5±0,15	34,3±0,11
	область последнего межреберного промежутка	33,5±0,14	33,6±0,11	33,4±0,12
февраль	область живота	34,7±0,15	34,5±0,12	34,4±0,10
	область последнего межреберного промежутка	33,1±0,16	33,4±0,17	33,2±0,13

Не установлено отрицательного влияния применения резиновых покрытий для мест отдыха коров на физиологическое состояние в зимний период. Так, в декабре температура в области живота находилась в границах 34,3–34,6°С, в области последнего межреберного промежутка изменялась незначительно и находилась в пределах физиологической нормы. В январе месяце измеренная температура в области живота и последнего межреберного промежутка изменялась незначительно и находилась в пределах 34,2–34,5°С и 33,4–33,6°С соответственно. При измерении температуры поверхности кожи в феврале следует отметить, что значительных различий между группами не установлено. Так, температура

в области живота составила при измерении 34,4–34,7°С, в области последнего межреберного промежутка – 33,1–33,4°С соответственно в исследуемых группах.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенными исследованиями установлено, что применение в качестве подстилочного материала отечественных резиновых покрытий производства «Белшина» при беспривязно-боксовой системе содержания не оказывает отрицательного влияния на физиологические показатели коров и не уступает аналогам импортного и отечественного производства по теплотехническим показателям.

### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Зоогигиена: учебник / И.И. Кочиш [и др.]; под ред. И.И. Кочиша. – СПб.: Изд-во "Лань", 2008. – 464с.
- 2 Интенсификация производства молока: опыт и проблемы: монография / В. И. Смунев [и др.] // – Витебск: ВГАВМ, 2011. – 486 с.
- 3 Курак, А.С. Обеспечить комфортные условия содержания для коров не менее важно, чем накормить / А.С. Курак // Наше сельское хозяйство. – 2011. – № 3. – С. 69–75.
- 4 Леткевич, И. Ф. Технологическое и зоогигиеническое обоснование новых конструкций полов на основе полимерных материалов в помещениях для крупного рогатого скота и свиней: дис. ... док. с.-х. наук : 06.02.04, 16.00.08 / И. Ф. Леткевич; Бел. науч.-исслед. ин-т. животноводства – Жодино, 1984. – 351 с.
- 5 Новые типы полов для крупного рогатого скота / Плященко С.И. [и др.]. – Ветеринария. – 2008. – № 6. – С. 55–57.
- 6 Хазанов, В. Е. Повышение эффективности производства молока путем совершенствования технологии и технических средств беспривязного содержания и обслуживания крупного рогатого скота: автореф. дис. ... канд. техн. наук : 05.20.01 / В. Е. Хазанов; Северо-Запад. научн.-исслед. ин-т механ. и электриф. с.х. Росс. акад. с.-х. наук – СПб, 2011. – 18 с.
- 7 Хайтмюллер, Х. Комфортные отели для коров /Х. Хайтмюллер // Новое сельское хозяйство. Спецвыпуск «Современные молочные фермы», 2007. – С. 24–29.