

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**
Республиканское унитарное предприятие
«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ
имени С.Н. ВЫШЕЛЕССКОГО»

Международная научно-практическая конференция

**АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ
БИОТЕХНОЛОГИИ В АГРАРНО-
ПРОМЫШЛЕННОМ КОМПЛЕКСЕ**

26–27 ноября 2015 года

Минск 2015

УДК 60:63:005.745(06)

ББК

В

Печатается по решению **Ученого совета**
РУП «Институт экспериментальной ветеринарии
им. С. Н. Вышелесского»

Редакционная коллегия:

П.А. Красочко (главный редактор), **М.В. Якубовский** (зам. главного редактора), **Н.А. Ковалев**, **М.П. Кучинский**, **И.А. Красочко**, **А.П. Лысенко**, **И.В. Насонов**, **Ю.В. Ломако**.

Актуальные проблемы биотехнологии в аграрно-промышленном комплексе: материалы международной научно-практической конференции, Минск, 26–27 ноября 2015 г. / РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»; под ред. **П.А. Красочко**. – Минск, 2015. – 424с.

Опубликованные материалы представляют собой результаты экспериментальных исследований по вирусным и микробным болезням сельскохозяйственных животных, по эпизоотологическим и диагностическим методам исследований, лечению и профилактике паразитарных, заразных и незаразных болезней.

Материалы рассчитаны на широкий круг специалистов в области ветеринарии и смежных наук.

Ответственность за достоверность публикуемых данных несут авторы материалов. Аналитические материалы отражают точку зрения автора. Мнения, высказанные на страницах сборника, не всегда совпадают с точкой зрения редакции.

© РУП «Институт экспериментальной
Ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»

Раздел 1. БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 619:615.37.02

ПРОМЫШЛЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ В ВЕТЕРИНАРИИ

А.Я. САМУЙЛЕНКО, С.А. ГРИНЬ, В.Н. БОРОВОЙ,
Н.В. МЕЛЬНИК, Р.Н. МЕЛЬНИК, А.Я. ДАДАСЯН

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», г. Щелково, РФ

Поступила в редакцию 10.07.2015г.

Развитие биотехнологии в XXI веке является приоритетом высшего порядка. Биотехнология во многом стала определять развитие научно-технологического прогресса и благосостояние общества в мире. Известно, что продукция, получаемая с помощью промышленной биотехнологии, имеет выход практически во все отрасли народного хозяйства: сельское хозяйство, медицину, ветеринарию, пищевую промышленность, химическое производство, энергетику и экологию.

Значение развития биотехнологии повышается в связи с глобальными изменениями на земле, связанными с ухудшением экологии, гиперболическим приростом народонаселения и давлением его жизнедеятельности на биосферу, снижением природных ресурсов и другими факторами [1].

По данным Всемирной организации здравоохранения рост населения с 6 млрд. чел. в 2000г. достигнет к 2025 году 9,4 млрд. чел., ежегодный дефицит белка в настоящее время уже составляет 15 млн. тонн и будет возрастать. Самый эффективный способ получения белка – биотехнологический (микробиологический синтез), который в 10–100 тыс. раз эффективнее, чем получение белка традиционными методами в сельскохозяйственном производстве.

В настоящее время ежегодный рост мирового рынка биотехнологий составляет 7–9 процентов. При этом в США создается почти половина мирового объема биотехнологической продукции. Второй по размерам рынок – это Азиатско-Тихоокеанский регион, где наиболее динамично развиваются биотехнологии Китай, Индия, Австралия и Япония. Замыкает тройку лидеров Европа.

В ведущих странах мира для развития биотехнологии созданы специальные программы, приняты соответствующие законы, установлены экономические преференции, вкладываются крупные инвестиции в фундаментальные исследования и технологические разработки.

Доля России в мировом объеме биотехнологической продукции мала (в 2010 г. около 0,3%). Это явно не соответствует интеллектуальному, научно-технологическому и ресурсному потенциалу страны.

В настоящее время государственная политика в нашей стране в отношении развития биотехнологии меняется. В Концепции долгосрочного со-

циально-экономического развития Российской Федерации биотехнология включена в основные приоритеты. В перечне критических технологий из 34 технологий 16 являются сферой ответственности биотехнологии [2]. Правительством РФ приняты ряд «Технологических платформ», которые являются инструментом осуществления научно-технической и инновационной политики в практической биотехнологии [3]. Важнейшая из них технологическая платформа «Биоиндустрия и Биоресурсы – «БиоТех 2030». Разрабатывается ряд долгосрочных стратегических программ развития биотехнологии, результаты выполнения которых будут существенно влиять на развитие экономики страны и качество жизни населения.

В научно-технических программах планируется проводить работу по десяти направлениям промышленной биотехнологии, в том числе сектору «Биоиндустрии в сельском хозяйстве» и «Промышленные биотехнологии», включающие все основные научные направления деятельности Всероссийского научно-исследовательского и технологического института биологической промышленности (ВНИТИБП). Это ветеринарная биотехнология, иммунобиологические препараты, клеточная и генная инженерия, диагностика, препараты из натурального сырья, кормовые добавки, биоудобрения, переработка и утилизация отходов биопроизводства, охрана окружающей среды.

Основной целью стратегии развития биотехнологии в ветеринарии является создание современных модернизированных промышленных биопредприятий по производству препаратов нового поколения для профилактики, диагностики и лечения болезней животных, обеспечивающих сохранение ветеринарного благополучия, продовольственной и экологической безопасности страны. При этом ставится цель, чтобы отечественная продукция соответствовала мировым стандартам и была импортозамещающей.

Считается, что важным условием реализации поставленных задач является новая форма объединения – «биокластер». Это триединство «наука - образование - практика», т.е. сотрудничество академических научных организаций, вузов и производств позволит ускорить внедрение научных разработок в практику. Вторым важным условием является совершенствование международного сотрудничества российских институтов в рамках общих программ стран СНГ, евразийского пространства – ЕврАзЭС, ЕвразияБио и Азиатского тихоокеанского экономического сотрудничества (АТЭС) [4]. Третьим важным условием является совершенствование системы образования и подготовки кадров.

История производства ветеринарных биологических препаратов в промышленных объемах в нашей стране насчитывает более 100 лет, она непосредственно была связана с деятельностью 25 крупных предприятий, выпускающих более 250 наименований иммунобиологических биопрепаратов, которые полностью удовлетворяли потребности большой страны.

В настоящее время таких предприятий осталось пять. Это Курская, Армавирская, Ставропольская биофабрики, Щелковский биокombинат и Покровский завод биопрепаратов. Несмотря на малочисленность государственных предприятий, они вместе с государственными научно-исследовательскими учреждениями, имеющими собственные эксперимен-

тальные производства, выпускают до 90% биопрепаратов ветеринарного назначения – вакцин, диагностикумов, лечебных сывороток и биостимуляторов. В настоящее время объем российского рынка ветеринарных препаратов оценивается в 4 млрд. рублей, средние темпы роста за последние 4 года – 8–9%. Это примерно соответствует темпам роста продаж ветеринарных препаратов на мировом рынке. В стране имеются ветеринарные биопрепараты, которые осваивают зарубежные рынки, в первую очередь в странах СНГ и ШОС.

Достоинством российских биопрепаратов является их высокое качество и надежность, т.к. их производство ведется с использованием штаммов возбудителей, выделенных на территории бывшего Союза. Поэтому применение отечественных препаратов теоретически и практически оправдано по сравнению с препаратами зарубежных фирм, которые также присутствуют на рынке в большом количестве. Так, из зарегистрированных для применения в ветеринарной практике 1065 вакцин 344 – зарубежного производства.

На протяжении последних лет биопредприятия и научно-исследовательские институты стали разрабатывать программу импортозамещения актуальных и перспективных ветеринарных биопрепаратов.

Единственным путем успешного развития отечественных промышленных биопредприятий, их модернизации является внедрение в производство результатов научных исследований и прикладных разработок. В научно-исследовательских институтах созданы десятки новых лекарственных средств для защиты животных, растений, средств воспроизводства плодородия почв и других средств, обеспечивающих повышение эффективности функционирования АПК, которые, однако, не завершены производством в промышленных объемах.

Дальнейший рост объемов отечественной продукции и объемов ее экспорта имеет серьезные ограничения, обусловленные разными причинами, а именно, необходимостью глубокой модернизации технической и технологической базы биопредприятий и внедрения на предприятиях интегрированной системы менеджмента качества в соответствии с международными требованиями. Имеются трудности освоения современных промышленных биотехнологий из-за слабой координации между организациями, занимающимися научными разработками (институтами) и внедрением их результатов в производство на биопредприятиях. Большие трудности разработчики биопрепаратов испытывают на этапах проведения доклинических, клинических и производственных испытаний разрабатываемой продукции.

Для апробации и отработки технологий разработанных в различных организациях биопрепаратов ветеринарии и сокращения сроков освоения их в промышленное производство необходимо создание научно-производственной базы (пилотного производства), отвечающей современным требованиям и международным стандартам к биологическому производству. Для расширения ассортимента биологической продукции для АПК, повышения ее качества, конкурентоспособности, снижения сроков промышленного освоения технологий и приближения производителя биологической продукции к потребителю актуальной проблемой, на наш взгляд, является организация в стране сети региональных многопрофильных мобильных предприя-

тий, созданных по типовым проектам и создание центров обучения специалистов-биотехнологов.

Научные разработки ВНИТИБП базовой (универсальной) гибкой технологической линии с набором специализированного оборудования, соответствующего требованиям GMP, могут быть основой для создания таких мобильных производств [5].

Институт совместно с другими научными учреждениями разработал Концепцию научного и производственного обеспечения развития отечественной биологической промышленности путем модернизации существующих и создания новых региональных биопредприятий, способных обеспечить получение конкурентоспособной, экологически безопасной продукции, и повысить эффективность функционирования различных отраслей агропромышленного комплекса страны. В 2010 году Концепция была одобрена Президиумом Россельхозакадемии [6].

В Концепции изложены основные этапы научного обеспечения модернизации промышленности и создания региональных предприятий для производства конкурентоспособной продукции по инновационным технологиям и ожидаемые результаты ее реализации.

Региональные предприятия (минибиоцеха) должны быть построены на модульной основе (модульных конструкциях) по типовым проектам. Целесообразно такие биоцеха размещать в местах максимально приближенных к поставщику сырья и к потребителю продукции. Приближение источников производства к потребителям устраним многие негативные факторы при крупном производстве, даст дополнительную прибыль от экономии энергоресурсов и значительно повысит качество скоропортящейся биологической продукции.

В результате анализа научных разработок биопрепаратов по технологиям их изготовления сделан вывод о том, что на региональных биопредприятиях возможно освоить выпуск следующей биологической продукции:

- лечебно-профилактические препараты для защиты животных (в основном, на основе непатогенной микрофлоры);
- пробиотики, пребиотики, симбиотики, эубиотики;
- кормовые пищевые белковые продукты, в том числе на основе биоконверсии зерносырья;
- биопрепараты для восстановления и повышения плодородия почв;
- биопрепараты для защиты растений и повышения качества продукции растениеводства;
- стимуляторы роста растений;
- сырье и полуфабрикаты для фармацевтических производств [7].

Анализ технологии изготовления биологических препаратов различного назначения показывает, что многие производственные этапы можно унифицировать. Это касается процессов приготовления и стерилизации питательной среды, культивирования и концентрирования микроорганизмов, фасовки и оформления готовой продукции и прочее.

В таблице дана общая характеристика биоминицеха на основе модулей с производительностью 70 т в год препаратов на основе микробиологического синтеза.

По предварительным подсчетам потребность в стране может составлять до 1000 таких биофабрик, которые целесообразно разместить в регионах с развитым сельскохозяйственным производством вблизи от потребителей и источников сырья.

Таблица 1 – Промышленная биотехнология в ветеринарии

Наименование показателей	Ед.изм	Нормативы
Производственная площадь	м ²	1000
Численность персонала	чел.	30
Емкостное оборудование (от1-1000 л)	шт.	100
Потребность в питательных средах	т/год	100
Расход воды	т/год	130-150
Потребность в электроэнергии	тыс.кВт/год	900
Потребность в тепловой энергии	Гкал/год	50
Стоимость сооружений	млн./руб.	45
Стоимость оборудования и сырья	млн.руб.	55
Производительность	т/год	70
Экономическая эффективность	млн./год	90

Этапы реализации сформированной Концепции по научному обеспечению модернизации биологической промышленности путем создания региональных предприятий предполагают:

- мониторинговые и маркетинговые исследования рынка продукции, размещения биофабрик с учетом экономической целесообразности;
- создание специализированных банков биологических агентов, в частности, коллекции генетически охарактеризованных микроорганизмов для конструирования новых, полезных биопрепаратов;
- проведение научных исследований по разработке новых биопрепаратов с апробацией полученных результатов на опытной научно-технологической базе ВНИТИБП с использованием пилотной технологической блочно-модульной линии для дальнейшего освоения препаратов на региональных биопредприятиях;
- разработку и реализацию проектов биопредприятий (модулей с гибкими технологическими линиями и оборудованием), отвечающих требованиям GMP;

Реализация мероприятий по созданию региональных биологических предприятий приведет к расширению ассортимента и увеличению объема производства отечественных биопрепаратов, препаратов для защиты животных, растений и средств, обеспечивающих повышение эффективности функционирования АПК; снижению зависимости от импорта биопрепаратов; сохранению и восстановлению плодородия почв; обеспечению продовольственной, экологической и биологической безопасности страны.

Наличие имеющегося потенциала биотехнологической науки при эффективной государственной поддержке позволит решить проблему получения конкурентоспособной биологической продукции и удовлетворения спроса на отечественную продукцию, который все более повышается.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Боро, И.Л., Эрнст, К.Л., Самуйленко, А.А. Эволюция биотехнологии в процессе развития человеческого общества // Ветеринарный врач. – Казань, 2010. – №6. – С. 3 –7.
- 2 Концепция социально-экономического развития Российской Федерации на период 2020 года, утв. Правительством РФ 17.11.2008 №1662-р.
- 3 О развитии прикладной биотехнологии в Российской Федерации. Перечень технологических платформ, утв. Правительственной комиссией по высоким технологиям и инновациям 01.04.2011 г., протокол №2.
- 4 Межгосударственная программа инновационного сотрудничества государств – участников СНГ на период до 2020 г., утв. 18.10.2011 г.
- 5 Рубан, Е.А., Самуйленко, А.А. Производство ветеринарных препаратов с использованием гибких технологических линий// Вестник РАСХН. – 2006. – №3. – С.55–56.
- 6 Концепция научного обеспечения создания и развития региональных биологических предприятий по производству препаратов для защиты животных, растений и средств, повышающих эффективность функционирования агропромышленного комплекса Российской Федерации, ВНИТИБП, М., – 2011. 12.
- 7 Самуйленко, А.А., Боро, И.Л., Гринь, С.А. Научное обеспечение многопрофильных биологических производств инновационными технологиями // Вестник РАСХН. – 2011. – №1. – С.33–34.

УДК 619:616.578.835

ТЕСТИРОВАНИЕ БИОПРЕПАРАТОВ – ЗВЕНО В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ЦЕПИ

З.С. КЛЕСТОВА, А.М. ГОЛОВКО

*Государственный научно-контрольный институт биотехнологии
и штаммов микроорганизмов, г. Киев, Украина*

Поступила в редакцию 01.07.2015 г.

Применение животных в качестве моделей широко использовали в исследованиях, а также при разработке и доказательстве безопасности и эффективности новых ветеринарных, фармакологических, пищевых и других продуктов. Однако многие аспекты негативного воздействия этих продуктов на человека и животных все же возникало, что побудило к разработке новых методов тестирования, в которых срочно нуждается общество.

Глобализация мира приводит к общему регулированию рынков некоторой продукции, в том числе лечебно-профилактической. Разрабатываются совместные требования как к качеству продукции, так и к методам ее разработки, оценки и исследований. При несоблюдении этих требований продукт не будет конкурентоспособным и его не допустят на европейские или другие мировые рынки.

Поэтому особенно важным для Украины в условиях интеграционных процессов, при выходе украинской продукции на внешние рынки является соответствующая валидация методов, применяемых в лабораториях ветеринарной медицины при разработке и контроле ветеринарных лечебных и профилактических препаратов, в том числе и созданных биотехнологическим путем. Одним из важных моментов в современном научном пространстве является разработка новых методов, позволяющих максимально исключить животных из экспериментов.

Остановимся на таком моменте, как применение альтернативных методов *in vitro* при замене опытов на животных. Почему это важно? Потому что, например, некоторая фармакологическая продукция (также как и косметологическая) представлена на зарубежных рынках (в том числе европейском) при условии, что при их разработке и тестировании не использовали животных. Что касается ветеринарных препаратов, такая же тенденция сейчас набирает силу.

Примерами могут служить зарубежные ветеринарные иммунобиологические средства, такие как «Вакцина против актинобациллеза свиней (инактивированная)», «Вакцина против атрофического ринита свиней (инактивированная)», в которых при тестировании вместо применения двух доз вакцин на целевых животных применяют тест «Испытание остаточной токсичности», так же как и при тестировании «Вакцины против столбняка для ветеринарного использования», где вместо применения морских свинок при определении безопасности произошла замена на тот же тест. Замена теста безопасности на целевых видах животных (TABST) при тестировании

всех ветеринарных вакцин (контроля конечного продукта) началась в ЕС с июня 2012 года и осуществляется в связи с введением так называемых «3Rs» принципов, а после 01.04.2013 владельцы регистрационных свидетельств на ветеринарные препараты должны предоставлять варианты отмены TABST теста и для других вакцин согласно Европейской Фармакопеи (Coordination Group for Mutual Recognition and Decentralised Procedures-Veterinary (CMDv), UK, 26.11.2012).

Сильным стимулом к развитию концепции 3Rs принципов и внедрению альтернативного тестирования стало мировое движение за права животных. В 2010 году Европейский Союз адаптировал Директиву 2010/63 / EU для защиты животных, применяемую в научных целях, которая полностью начала действовать с 1 января 2013 года. Европейская Комиссия решительно поддерживает усилия поиска альтернативных методов тестирования на замену тестирования на животных. В тех случаях, когда это совершенно невозможно, количество животных, задействованных в эксперименте, ограничивают или методы тестирования улучшают таким образом, чтобы в случае применения животных нанести им наименьший вред.

В 1990 году Центр США по альтернативному тестированию на животных (US Center for Alternatives to Animal Testing, CAAT) рекомендовал новую токсикологическую парадигму, которая в настоящее время является рутинной, и минимизирует тестирование на животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, альтернативная токсикология *in vitro* при тестировании ветеринарных биотехнологических продуктов требует новых методологических подходов, что достигается развитием высокопроизводительных тестов с применением клеток и линий тканей животных и человека, куриных эмбрионов, химических тест-систем и других виртуальных моделей, созданных с помощью компьютерных систем, которые безусловно вытеснят тесты на животных.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 *Proceedings. Human Science in the 21st Century//Abstracts of the 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences. Springer.–2014, 24–28 August.–320p.*
 - 2 Russel, W.M.S., Burch, R.L. *The Principles of Humane Experimental Technique.–London.– UK: Methuen and Co. Ltd.– 1959.*
 - 3 Seiler, J.P. *Good Laboratory Practice-the Why and How (2th Edition).:Springer-Verlag Berlin Heidelberg.– New York. –2005.– 424p.*
 - 4 Hartung, T., Balls, M., Bardoille, C., et all. *Good Cell Culture Practice//ECVAM Good Cell Culture Practice Task Force Report 1. Altern. Lab. Anim.–2002.–30.–P.407–414.*
- УДК 57.083.132**

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ВЫБОР ФЕРМЕНТАЦИОННОГО ОБОРУДОВАНИЯ

А.А. РАЕВСКИЙ

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический

УДК 619:615.37.012

ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ

Н.К. ЕРЕМЕЦ

*ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический
институт биологической промышленности», г. Щелково, РФ*

Поступила в редакцию 10.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Основная характеристика лекарственного средства (ЛС), определяющая его применение в медицинской практике, складывается из трех составляющих качества: безопасность, эффективность и стабильность (в соответствии с формулировкой Международной конференции по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных средств для человека – ICH). В настоящее время в фармацевтической промышленности все более пристальное внимание уделяется вспомогательным веществам (ВВ), которые вводят в состав ЛС с целью обеспечения этих свойств, а также улучшения технологических характеристик препарата.

Согласно Глоссарию терминов [1] «...вспомогательные вещества – вещества неорганического или органического происхождения, используемые в процессе производства лекарственных препаратов для придания им необходимых физико-химических свойств. Вспомогательные вещества вводят в состав лекарственного препарата с целью образования лекарственной формы, обеспечения технологии ее получения, стабильности и оптимального терапевтического эффекта».

К ВВ относятся различные классы веществ, общим для которых является обеспечение определенных специфических (полезных) свойств лекарственного препарата и технологических функций при его изготовлении.

Свойства ВВ, влияющие на показатели качества и технологичности готовой лекарственной формы, необходимо учитывать уже на стадии разработки новых или усовершенствования (модификации) уже существующих ЛС [2, 3]. Одним из требований к составу лекарственного препарата является функциональная обоснованность применения вспомогательных веществ (документы ICH, EC, FDA).

Сегодня это направление усиленно развивается для препаратов химико-фармацевтической природы, в отношении же биофармацевтических медицинских препаратов эта работа только начинается.

Под биофармацевтическими препаратами принято понимать препараты, полученные на основе генно-инженерных технологий, иммунобиологические (вакцины, сыворотки, диагностикумы), препараты группы крови, а также препараты, полученные из биологических материалов и обладающие физиологической активностью (гепарин, актовегин, диавитол, церебролизин, декстраны и др.) [1].

В связи с изменением законодательной базы в области разработки, обращения и применения ЛС [4, 5] на сегодняшний день решение этих вопросов становится актуальным и в сфере разработки и применения ветеринарных препаратов [6].

Подход, используемый в настоящее время, для классификации и характеристики специфических (полезных) свойств и технологических функций ВВ является эмпирическим. Это привело к тому, что в разных странах используются разные термины для обозначения одной и той же функции и наоборот, один термин применяется для обозначения разных механизмов действия веществ. Отсутствие систематизации вышеуказанных функций является существенным препятствием в обосновании применения вспомогательных веществ в составе лекарственного средства.

Особую роль в обеспечении надлежащего качества принадлежит лекарственной форме, ее составу и технологии производства. На примере воспроизведенных препаратов (дженерики и орфанные препараты) убедительно доказано, что производство лекарственных форм по «стандартным» технологиям не всегда является гарантией высокого качества лекарственного препарата.

Замена ВВ на более доступные, использование различных видов технологического оборудования, а значит и различных технологических условий получения/переработки сырья дает множество факторов, суммирование которых способно привести к значительным изменениям характеристики лекарственного препарата.

Долгое время ВВ считались безопасными. Однако появившиеся в последние годы в научной печати публикации заставили пересмотреть их роль в обеспечении безопасности и эффективности лекарственного средства (Golightly L.K., 1988г.; Weiner M., 1989г.; Wong Y.I., 1993г.; Osterberg R.E., 2003г.; Pifferi G., Restani P., 2003г. и др.).

В современном производстве биотехнологических препаратов традиционно выделяются следующие группы ВВ: в составе препарата – питательные среды, стабилизаторы (защитные среды), инактиванты, адъюванты, консерванты, бактериостатики (антибиотики), вещества, обеспечивающие транспортную функцию; в комплексе с препаратами – разбавители и растворители.

В традиционном производстве вакцин (вирусных и бактериальных) наиболее часто используют следующие ВВ.

Питательные и защитные среды могут быть как специфическими (для отдельных антигенов), так и универсальными (подходящими для групп антигенов). Стабилизаторы добавляют к вакцине, чтобы защитить антигены от неблагоприятных условий, которые могут повлиять на эффективность, и позволяют хранить вакцину в течение длительных периодов времени. Эти группы веществ представляют собой сложные комплексы (часто биологической природы), поэтому для них вопрос стандартизации состава и свойств особенно актуален и требует тщательного изучения.

Адъюванты и сорбенты – вещества различной химической природы, которые применяют совместно с антигеном для усиления потенцирующего действия на иммунную систему организма. К ним относятся ГОА, сапони-

ны, минеральные масла и их эмульсии, липосомы, полисахариды, полинуклеотиды, витамины, гормоны, полиэлектролиты, полный и неполный адъювант Фрейнда, аэросилы и бентониты и др. добавленные к вакцинам, чтобы помочь повысить иммунную реакцию организма. Адъюванты позволяют снизить количество вакцинного антигена, но сохранить необходимую силу воздействия антигенов на иммунную систему, чтобы вызвать ее ответ.

Инактиванты – вещества, обеспечивающие, с одной стороны, целостность протективного антигена, с другой – полноту инактивации инфекционного начала (формальдегид, димер этиленмина, β -пропиолактон метилглюксаль и др.).

Консерванты – вещества (тиомерсал, фенол, феноксиэтанол и др.), которые используются для предотвращения бактериального и грибкового загрязнения вакцины после ее изготовления. Это особенно важно, когда в первичной упаковке содержится несколько доз вакцины. Эта группа веществ вызывает большие дискуссии по поводу безопасности для макроорганизма, что может быть предметом как объективных, так и спекулятивных исследований, например, связь между применением тиомерсала в качестве консерванта в детской вакцине КПК (против кори, эпидемического паротита и краснухи) и увеличением уровня детского аутизма. Однако многие исследователи считают, что низкие уровни этих соединений, присутствующих в дозах вакцины, не связаны с какими-либо вредными последствиями.

Бактериостатики – вещества, которые используются для предотвращения бактериальной контаминации в процессе изготовления вакцин. Для вирусных вакцин наиболее часто применяют антибиотики. Следовые количества их остаются в конечном продукте и могут вызывать негативные последствия (аллергические реакции, явление антибиотикорезистентности и др.).

Разбавители (для жидких вакцин) и *растворители* (для сухих вакцин) используют при применении вакцины для получения требуемой концентрации антигена. Чаще всего используют стерильную воду или солевой раствор. Однако современные разбавители и растворители представляют собой сложные комплексы веществ, которые обеспечивают сохранность антигена в процессе применения и тем самым повышают эффективность вакцинации.

Вода (после различной степени очистки) является основным и незаменимым компонентом питательных и защитных сред и растворов, используемых в биотехнологии.

Таким образом, актуальной проблемой фармацевтической и биотехнологической науки на современном этапе является разработка методологического подхода создания национальной номенклатуры вспомогательных веществ, методологических основ стандартизации групп веществ в соответствии с номенклатурой, систематизация их технологических функций, а также изучение свойств и качества вспомогательных веществ.

ВНИТИБП в соответствии со своим статусом стоял у истоков работы по обеспечению качества лекарственных средств для ветеринарии и в настоящее время принимает активное участие в разработке Систем менеджмента качества для биологических производств. В институте накоплен

большой опыт в аспекте разработке новых и усовершенствования существующих вирусных и бактериальных вакцин [6]. В 2007 г. сотрудниками института совместно с РОАО «Росагробропром» были разработаны «Методические рекомендации по разработке и реализации проекта создания нового лекарственного средства», утв. РАСХН, в которых был учтен также собственный опыт по стандартизации и применению вспомогательных веществ.

Работа в данной области велась по следующим направлениям:

- питательные среды – стандартизация по физико-химическим и биохимическим показателям белковых гидролизатов – основ питательных сред для производства вирусных (противоящурная, против болезни Ауески) и бактериальных (против рожи свиней, пастереллеза) вакцин;

- защитные среды – стандартизация по физико-химическим и биохимическим показателям белковых гидролизатов – основ защитных сред для производства вирусных и бактериальных вакцин. Разработаны составы защитных сред для вакцин против рожи свиней и пастереллеза, универсальных для вирусных и бактериальных вакцин;

- адъюванты – разработана технология получения геля ГОА для противоящурных вакцин; показана необходимость оценки морфологии, фазового состава и удельной поверхности; установлена связь физико-химических показателей с адсорбционной активности к вирусу ящура; разработаны условия сорбции вируса ящура и вируса болезни Ауески;

- сапонины – проведены сравнительные исследования токсичности сапонинов импортного производства («Merk», США; «BDH», Англия; «Рон-Пуленк», Франция) и отечественного (теасапонин, аллохрозид и др.). Изучены фракционный состав методом хроматографии; гемолитическая активность и токсичность на тест-объектах различной сложности (культуры клеток, куриные эмбрионы, лабораторные животные);

- минеральные масла – проведены исследования по изучению стабильности эмульсий в зависимости от вида и состава для бактериальных вакцин;

- аэросилы и бентониты – сравнительные исследования сорбционной активности для концентрирования вирусных и бактериальных антигенов на примере противоящурной и ньюкаслской вакцин;

- инактиванты – проведены исследования и определены режимы инактивации вируса ящура, изучена динамика инактивации и свойства вируса при хранении;

- растворители – разработаны для сухой вакцины против болезни Марека и для сухих вакцин против НБ, рожи и пастереллеза сложного состава на основе белкового гидролизата.

Результаты проделанной экспериментальной работы отражены в научных отчетах, нормативной документации, публикациях и патентах, а также в Методических рекомендациях и Положениях, утвержденных РАСХН в соответствующем порядке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные разработки апробированы и внедрены в производстве лекар-

ственных средств для животных.

В методическом плане результаты исследований могут быть полезны для разработчиков и производителей лекарственных средств для ветеринарии, а также использованы в образовательном процессе для студентов, обучающихся по специальности «Биотехнология».

ЛИТЕРАТУРА

1 *Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли / Под ред. С.Н. Быковского, И.А. Василенко, Н.Б. Деминой [и др.] – М., Изд-во Перо, 2015. – 472 с.*

2 *ICH Q8 «Фармацевтическая разработка».*

3 *Самуйленко, А.Я. Методические рекомендации по разработке и реализации проекта создания нового лекарственного средства. Обеспечение качества лекарственных средств для животных в процессе разработки / А.Я. Самуйленко, В.И. Еремец, А.И. Шурыгин [и др.] – М., 2009. – 62с.*

4 *Приказ Министерства промышленности и торговли РФ № 916 от 14 июня 2013 г. Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств.*

5 *Федеральный закон № 61 – ФЗ «Об обращении лекарственных средств» от 12 апреля 2010 с изменениями. Вступает в действие с 1 июля 2015 года.*

6 *Самуйленко, А.Я. Нормативные и информационно-справочные документы по вопросам обеспечения безопасности и качества лекарственных средств для животных / А.Я. Самуйленко, Т.А. Скотникова, Л.А. Неминущая [и др.] // Известия Самарского науч. центра РАН. – 2011. – Т.13, №5(3). – С.181–184.*

институт биологической промышленности», г. Щелково, РФ

Поступила в редакцию 10.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее значимых технологических этапов в производстве биологических препаратов, предназначенных для специфической профилактики инфекционных заболеваний бактериальной этиологии, является культивирование микроорганизмов. Именно на этой технологической стадии производства вакцин происходит синтез антигенов, от которых зависит эффективность иммунных препаратов. В процессе выращивания микроорганизмов необходимо одновременно с увеличением выхода биомассы добиваться того, чтобы бактерии не изменяли свои биологические свойства.

В настоящее время получение бактериальной массы основано, в основном, на периодическом способе глубинного культивирования микроорганизмов.

Весьма актуальной является задача интенсификации процессов культивирования вакцинных штаммов с использованием современных математических методов оптимизации технологических процессов и последующий выбор ферментационного оборудования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследований служили несколько вакцинных штаммов *Pasteurella multocida*, используемых для изготовления вакцин против пастереллеза животных и птиц.

Для оптимизации условий роста использовали такие методы математического планирования эксперимента, как полный факторный эксперимент (ПФЭ) типа 2^5 , метод т.н. «крутого восхождения», метод Бокса-Уилсона, а также планы второго порядка.

Критерием оптимизации служило накопление (Y) жизнеспособных пастерелл. В качестве факторов выбраны следующие физико-химические параметры:

- X_1 – парциальное давление растворенного в культуральной жидкости кислорода (pO_2);
- X_2 – парциальное давление растворенного в культуральной жидкости углекислого газа (pCO_2);
- X_3 – концентрация глюкозы в культуральной жидкости;
- X_4 – pH;
- X_5 – температура культивирования.

Культуру пастерелл выращивали в колбах, в ферментерах АК-10-1, АНКУМ-2М емкостью 3 и 10 л и аппаратах фирмы «Электролюкс» (100 и 400 л), а также в модернизированном химическом реакторе емкостью 1000 л.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

После проведения экспериментов, статистической обработки их результатов и определения значимости коэффициентов уравнения регрессии получена следующая зависимость накопления пастерелл на начальной стадии роста от вышеуказанных факторов:

$$\tilde{Y} = 0,465 + 0,019X_1 + 0,071X_4$$

Расчетный критерий Фишера $F_p = 0,377$, табличное значение этого критерия $F_T = 1,52$, $F_p < F_T$, следовательно, линейное уравнение регрессии адекватно описывает экспериментальные данные и его можно использовать для поиска области оптимума.

Для поиска области оптимума использовали метод крутого восхождения. Получены следующие оптимальные с точки зрения накопления пастерелл при культивировании на начальной стадии роста значения физико-химических параметров:

- pO_2 – 16% от насыщения кислородом воздуха;
- pH – 8,4 ед pH ;
- температура – 35–40°C;
- концентрация глюкозы – 0,1 – 0,3%;
- pCO_2 – 30 – 90 мм рт.ст.

При интенсификация процесса культивирования пастерелл на логарифмической фазе роста получено следующее уравнение регрессии:

$$\tilde{Y} = 0,293 + 0,0166X_1 - 0,0364X_2 - 0,0119X_4.$$

Оно адекватно описывает экспериментальные данные, т.к. расчетное значение критерия Фишера, равное 0,49, меньше табличного значения этого критерия $F_T = 1,3$. Это уравнение можно использовать для поиска области оптимума.

Для дальнейшего поиска оптимума был выбран и реализован план второго порядка и получено следующее уравнение регрессии, адекватно описывающее экспериментальные данные:

$$\tilde{Y} - 0,441 = -0,0289X_1^2 - 0,0261X_2^2.$$

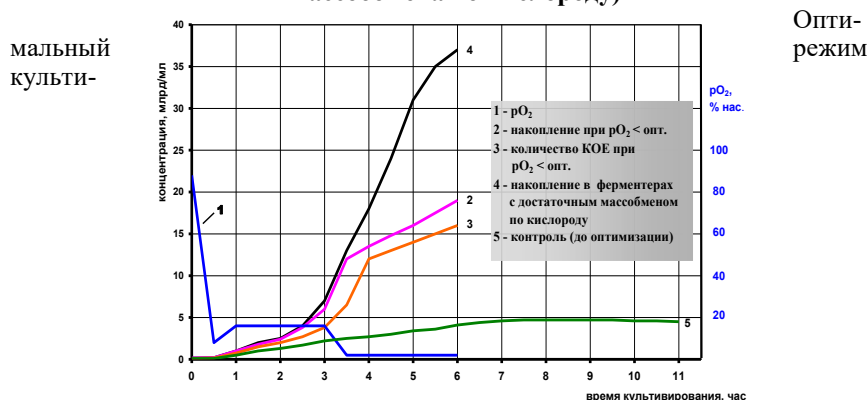
Коэффициенты канонической формы уравнения регрессии имеют одинаковые знаки, причем отрицательные, следовательно поверхность отклика представляет собой эллиптический параболоид, вершина которого является максимумом.

Координаты центра поверхности дают оптимальные для выращивания пастерелл на логарифмической фазе роста значения $pO_2 = 35\%$ нас. и $pH = 8,0$ ед.

По результатам экспериментов сформулирован алгоритм управления культивированием пастерелл с учетом фаз роста, в котором управляющими воздействиями явились pH , pO_2 , eH и концентрация глюкозы. На способ управляемого культивирования получен патент РФ № 1566533.

Результаты изучения популяции пастерелл в динамике роста свидетельствует о том, что создание оптимальных условий их культивирования интенсифицирует процесс с увеличением накопления живых клеток в 7 раз при сокращении времени выращивания в 3 раза по сравнению с существующей технологией (кривые 4 и 5 соответственно на рисунке.) и позволяет получать физиологически полноценную культуру, отвечающую требованиям, предъявляемым к ней при изготовлении биопрепаратов.

**Рисунок – Динамика накопления пастерелл в различных аппаратах
(1 - изменение pO_2 в аппарате, не обеспечивающем достаточного
массообмена по кислороду)**



вирования предусматривает поддержание растворенного кислорода в зависимости от фаз роста на уровнях 15 и 35% от нас. кислородом воздуха.

Отработку процесса выращивания *P. multocida* проводили на аппаратуре АНКУМ-2М в ферментерах емкостью 3 и 10 л, которая обеспечивала поддержание pO_2 на оптимальном для роста уровне даже на логарифмической фазе роста при концентрации более 40 млрд./мл.

При освоении технологии изготовления вакцин на одном из биопреприятий возникли трудности по поддержанию pO_2 на необходимом уровне.

Турбинная мешалка в этом аппарате имела скорость вращения всего 180 об/мин, система подачи стерильного воздуха позволяла подавать в аппарат не более 270 л/мин на 300 литров культуральной жидкости, что явно недостаточно, т. к. уже через 2,5 – 3 часа pO_2 снижался практически до нуля (кривая 1 рисунка), удельная скорость роста пастерелл значительно снижалась, наблюдался линейный рост культуры (кривые 2 и 3), что говорит о лимитировании роста пастерелл кислородом. Через 6 часов накопление составляло всего 15–18 млрд./мл.

После того, как для управляемого процесса культивирования стал использоваться ферментер фирмы «Электролюкс», проблемы исчезли.

Динамика роста пастерелл в этом ферментере емкостью 400 л стала аналогичной динамике в лабораторных аппаратах – максимальная удельная скорость роста составляла 1,7 – 1,8 1/час, продолжительность выращивания – 6 – 7 часов при накоплении до 50 – 60 млрд./мл.

Выход бактериальной массы штаммов АВ и К *P. multocida* с 1 л питательной среды на основе гидролизата Хоттингера был соответственно в 5,3 и 3,0 раза выше, чем в контроле при культивировании по существующей технологии. Это позволило получить с 1 л питательной среды 53 тыс. доз вакцины из штамма АВ и 52 тыс. доз – из штамма К, что соответственно в 13 и 7,5 раз больше, чем по существовавшей технологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на примере такого фактора как растворенный в культуральной жидкости кислород, экспериментально показано, что для проведения интенсифицированных (оптимизированных) процессов, весьма важна конструкция оборудования, которое на протяжении всего процесса периодического культивирования должно обеспечивать поддержание факторов на оптимальных уровнях.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Баснакьян, И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами. / И.А. Баснакьян // М., Медицина, 1992. – 192 с.
- 2 Бирюков, В.В. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза / В.В. Бирюков, В.М. Кантере // – М., – Наука, 1985. – 293 с.
- 3 Раевский, А.А. Разработка управляемого процесса культивирования *Pasteurella multocida* при производстве вакцин: авторск. дис...канд.биол.наук. – Щелково, 2002. – 26с.
- 4 Самуйленко, А.Я. Влияние способов культивирования на выход бактериальной массы и качества вакцин для ветеринарной медицины / А.Я. Самуйленко, А.А. Раевский, И.В. Павленко, Н.К. Еремец [и др.] // Вестник Казанского технол.ун-та. – 2013. – № 9. – С. 165–171.
- 5 Сусский, Е.В., Раевский, А.А., Ночевный, В.Т. Совершенствование и стандартизация технологии производства бактериальных антигенов: Тр. Кубанского гос. аграрного ун-та. – 2012. – № 1 (34). – С. 179–183.
- 6 Раевский, А.А., Самуйленко, А.Я., Школьников, Е.Э., Павленко, И.В. Управляемые процессы культивирования микроорганизмов при производстве бактериальных препаратов: мат. VI Моск. межд. конгр. «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – М., 2011. – Ч. 1. – С. 195–196.
- 7 Раевский, А.А. Определение оптимальных условий культивирования бактерий с учетом фаз роста при изготовлении вакцин // Веткорм. – 2012. – № 6. – 36–37.
- 8 Раевский, А.А., Самуйленко, А.Я. Разработка и моделирование управляемых процессов культивирования микроорганизмов при производстве биофармпрепаратов: мат.межд.научн.-практ. конф. «Фармацевтические и медицинские биотехнологии». – М., 2012. – С. 291–292.

УДК 579.2 + 579.6

ИТОГИ АПРОБАЦИИ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕПТИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ МЕТАБОЛИТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ ПОРОД КОНТРАСТНЫМ ТЕМПЕРАТУРНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ

М.В. НАРУШКО, А.М. СУББОТИН, С.А. ПЕТРОВ, В.А. МАЛЬЧЕВСКИЙ

Тюменский научный центр СО РАН, г. Тюмень, РФ

Поступила в редакцию 26.06.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы одной из актуальных проблем, стоящих перед человечеством является увеличение продуктивности зерновых культур (Коломиец Э.И., 2011). Учеными разрабатываются различные направления для решения данной проблемы. В настоящее время для повышения урожайности широко применяются минеральные удобрения и химические средства защиты растений. Однако их применение повышает опасность загрязнения окружающей среды. Одним из перспективных направлений является использование микроорганизмов в качестве фитостимуляторов. Они являются экологически чистыми и менее затратными в производстве.

Известно, что микроорганизмы в процессе жизнедеятельности выделяют большое количество биологически активных веществ, в том числе обладающих фитостимулирующими свойствами (Hung P.Q., 2007; Широких А.А., 2008; Иванчина Н.В., 2008; Sgroi F., 2009; Егоршина А.А., 2011). Для получения высокоактивных препаратов, созданных на бактериальной основе, необходим, во-первых, поиск высокопродуктивных штаммов, а, во-вторых, более высокоэффективные технологии микробного синтеза метаболитов.

На сегодняшний день существует ряд биопрепаратов, в том числе на основе бактерий из рода *Bacillus* (Фитоспорин-М, Бактофит, Гамаир, Интеграл и другие). Однако эффективность применения подобных препаратов в условиях северных регионов невысока, так как активность интродуцированных микроорганизмов (МО) связана с их приживаемостью в ризосфере и ризоплане (Сидоренко О.Д., 1999).

Микроорганизмы, выделенные из многолетнемерзлых пород (ММП), сохранившие жизнеспособность в течение длительного времени в условиях низких температур и замедленного метаболизма, вынужденные адаптироваться к неблагоприятным факторам среды, обладают высокой приспособляемостью к почвенно-климатическим условиям Западной Сибири (Каленова Л.Ф., 2013). Исходя из этого, нами была выдвинута гипотеза, что метаболиты данных микроорганизмов способны обладать фитостимулирующим эффектом. В связи с вышеизложенным, разработана высокоэффективная технология получения пептидных комплексов метаболитов микроорганизмов из ММП, безусловно, актуальна.

Цель данного исследования – разработать высокоэффективную технологию получения пептидных комплексов метаболитов микроорганизмов из ММП.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Метаболиты микроорганизмов получали по следующей методике. Штаммы бактерий высевали в 5 пробирок на скошенный питательный агар для

культивирования микроорганизмов (ГРМ-агар г. Оболенск. ТУ 9398-020-78095326-2006). Штаммы бактерий культивировали в термостате 24 часа при температуре +36°C. Производили смыв микроорганизмов из каждой пробирки 5 мл дистиллированной воды. Определяли концентрацию микроорганизмов культуральным методом предельных разведений по количеству КОЕ на агаризованной питательной среде в чашках Петри. После определения количества клеток бактерий в исходной суспензии плотность культур доводили до концентрации в 1×10^{12} м.к./мл (микробных клеток в 1 мл дистиллированной воды). Готовую рабочую суспензию бактериальных клеток помещали в холодильник с температурой минус 16°C на 72 часа (с оттаиванием 1 раз в сутки на 4 часа до полного оттаивания и затем вновь замораживали). Получали метаболиты методом фильтрования бактериальной взвеси через фильтр фирмы «Millipore» с диаметром пор 0,22 мкм (Durapore membrane filters, type 0.22 mm GV).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки эффективности разработанной методики был поставлен эксперимент на штамме *Bacillus sp.*, выделенном из ММП. Нами была поставлена серия из пяти вариантов опытов в зависимости от температурных условий, в которых осуществлялся микробиологический синтез пептидных комплексов метаболитов микроорганизмов. Первый опыт выполнен по методике «Способ получения высокоактивного посевного материала микроорганизмов» (Шишков Ю. И., 1999) без замораживания культуры. Во втором опыте использована методика «Способ получения высокоактивного посевного материала микроорганизмов» (Шишков Ю. И., 1999) с однократным замораживанием и оттаиванием культуры. Третий опыт осуществлен по методике «Способа получения высокоактивного посевного материала микроорганизмов» (Шишков Ю. И., 1999) с двукратным замораживанием и оттаиванием культуры. Четвёртый опыт осуществлялся по разработанному нами способу микробиологического синтеза пептидных комплексов метаболитов микроорганизмов с трёхкратным замораживанием и оттаиванием культуры. Пятый опыт выполнялся по методике «Способ получения высокоактивного посевного материала микроорганизмов» (Шишков Ю. И., 1999) с четырёхкратным замораживанием и оттаиванием культуры.

Общая масса пептидных комплексов в метаболитах микроорганизмов определялась биуретовым методом и методом жидкостной препаративной хроматографии на хроматографе фирмы «Gilson» согласно инструкции производителя. Результаты эксперимента отражены в таблице 1.

Таблица 1 – Общая масса пептидных комплексов в метаболитах микроорганизмов в г/л ($M \pm m$)

Примечание – ¹ достоверность различий при $p < 0,05$ между результатами опытов 1 и 2; ² достоверность различий при $p < 0,05$ между результатами опытов 1 и 3; ³ достоверность различий при $p < 0,01$ между результатами опытов 1 и 4; ⁴ достоверность различий при $p < 0,05$ между результатами опытов 1 и 5; ⁵ достоверность различий при $p < 0,05$ между результатами опытов 2 и 3; ⁶ достоверность различий при $p < 0,05$ между результатами опытов 2 и 4; ⁷ достоверность различий при $p < 0,05$ между результатами опытов 2 и 5; ⁸ достоверность различий при $p < 0,05$ между результатами опытов 3 и 4; ⁹ достоверность различий при $p < 0,05$ между результатами опытов 3 и 5; ¹⁰ достоверность различий при $p < 0,05$ между результатами опытов 4 и 5.

Анализ результатов, полученных биуретовым методом, позволил установить, что общая масса пептидных комплексов в метаболитах микроорга-

Методы исследования	Опыт				
	1	2	3	4	5
Биуретовый	0,31±0,01 1, 2, 3, 4	0,42±0,01 1, 6	0,43±0,02 2, 8, 9	0,74±0,01 3, 6, 8, 10	0,23±0,02 4, 7, 9, 10
Жидкостная препаративная хроматография	0,24±0,01 1	0,42±0,02 1, 5, 6	0,31±0,02 2, 5, 8, 9	0,63±0,02 3, 6, 8, 10	0,22±0,2 7, 9, 10

низмов в опыте 1 была достоверно снижена по сравнению с опытами 2 и 3 ($p<0,05$), а также относительно опыта 4 ($p<0,01$). Однако значения массы в опыте 1 достоверно ($p<0,05$) превышали данный показатель в опыте 5.

В опыте 2 (биуретовый метод) масса пептидных комплексов достоверно не отличалась от опыта 3, однако была достоверно ниже, чем в опыте 4 ($p<0,01$) и выше, чем в опыте 5 ($p<0,05$).

При сравнении опыта 3 с опытами 4 и 5 установлено, что исследуемый показатель был достоверно ($p<0,01$) снижен относительно результатов опыта 4, однако его значения достоверно ($p<0,05$) превышали показатели опыта 5 при использовании биуретового метода исследования.

В опыте 4 значения массы пептидных комплексов метаболитов также достоверно ($p<0,01$) превышали данный показатель в опыте 5 при биуретовом методе исследования.

Масса пептидных комплексов в метаболитах микроорганизмов, измеренная методом жидкостной препаративной хроматографии, в опыте 1 была также достоверно снижена относительно опытов 2, 3 ($p<0,05$) и 4 ($p<0,01$). Достоверных различий между опытами 1 и 5 не выявлено.

Методом жидкостной препаративной хроматографии установлено, что значения массы в опыте 2 достоверно превышали данный показатель в опытах 3 и 5 ($p<0,05$). В то же время масса пептидных комплексов во втором опыте была достоверно снижена относительно опыта 4 ($p<0,01$).

При сравнении опыта 3 (метод жидкостной препаративной хроматографии) с опытами 4 и 5 установлено, что исследуемый показатель был достоверно ($p<0,01$) снижен относительно результатов опыта 4, однако его значения достоверно ($p<0,05$) превышали показатели опыта 5.

В опыте 4 значения массы пептидных комплексов метаболитов также достоверно ($p<0,01$) превышали данный показатель в опыте 5 при исследовании методом жидкостной препаративной хроматографии. На разработанный нами способ подана заявка № 2015109582/10 (0115169) от 18.03.2015 на получение патента на изобретение в Роспатент РФ и получена приоритетная справка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан высокоэффективный способ получения пептидных комплексов метаболитов, основанный на контрастном температурном воздействии микроорганизмов. Разработанная технология позволяет увеличить выработку микроорганизмами общей массы пептидных комплексов метаболитов на 50–70%, по сравнению с существующими и, как следствие, снизить

себестоимость производства.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Коломиец, Э.И. Инновационные биотехнологии в экономике республики Беларусь/ Э.И.Коломиец // Микробные биотехнологии: Фундаментальные и прикладные аспекты. Сборник научных трудов. – Минск, 2011. – Т.3. – С. 7–19.
- 2 Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and cultivated soybean varieties / Hung P.Q., Kumar S.M., Govindsamy V., Annapurna K. // Biol. Fert. Soils. 2007. – V. 44. – № 1. – 155 p.
- 3 Выделение и оценка биорегуляторных свойств эндофитных бактерий / А.А. Широких, И.Г. Широких, С.Ю. Огородникова, О.В. Мерзаева // Теоретическая и прикладная экология. 2008. – № 3. – С.73 – 80.
- 4 Влияние штаммов *Bacillus subtilis* на продуктивность растений гороха (*Pisum sativum* L.) при автономной и совместной инокуляции со штаммом *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 1078 / Н.В.Иванчина, С.Р.Гарипова, Д.В.Шавалеева и др. // Агрохимия. 2008. – № 10. – С. 34–39.
- 5 Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera* / Sgroi F., Cassan F., Masciarelli O., et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. – V. 85. – № 2. – P. 371–381.
- 6 Участие фитогормонов в формировании взаимоотношений проростков пшеницы с эндофитным штаммом *Bacillus subtilis* 11BM / А.А.Егоришина, Р.М. Хайруллин, А.Р. Сахабутдинова, М.А. Лукьянцев // Физиология растений. – 2011. – Т. 58. – № 5. – С. 1–7.
- 7 Сидоренко, О.Д., Войно, Л.И. Использование микроорганизмов ризосферы в качестве перспективного бакпрепарата для возделывания сельскохозяйственных культур / О.Д. Сидоренко, Л.И. Войно // Вестник ТГУ, Т. 4. – Вып. 1. – 1999. – С. 87–91.
- 8 Калёнова, Л.Ф., Субботин, А.М., Бажин, А.С. Влияние бактерий из многолетнемерзлых пород разного геологического возраста на иммунную систему / Л.Ф. Калёнова, А.М. Субботин, А.С. Бажин // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. – 2013. – № 1. – С. 128.
- 9 Патент на изобретение № 2126445 Российская Федерация, МПК C12N1/00, C12N1/20, C12N1/16. Способ получения высокоактивного посевного материала микроорганизмов / Ю. И. Шишков. № 97103846/13; заявл. 11.03.1997; опубл. 20.02.1999.

УДК 636:59

ВИТРИФИКАЦИЯ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВОГО НОСИТЕЛЯ – ПОЛОГО ВОЛОКНА

Г.П. МАЛЕНКО, Е.В. КОРНИЕНКО, А.Б. РОМАНОВА,
Г.Ю. КОСОВСКИЙ

ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии и
репродуктивных биотехнологий», г. Москва, РФ

Поступила в редакцию 07.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Криоконсервация гамет и эмбрионов является существенным этапом в системе вспомогательных репродуктивных технологий как в медицинских

целях, так и в области животноводства. До настоящего времени в промышленном скотоводстве в технологии трансплантации для криоконсервации эмбрионов широко используется метод медленного программируемого замораживания, получивший развитие в 80-х годах (1,2,3,4,5). Однако в последнее десятилетие выходит за рамки лабораторных исследований и находит практическое применение для криоконсервации яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих метод витрификации. При этом признается, что витрификация является более эффективным методом криоконсервации таких криочувствительных объектов, как ооциты млекопитающих, эмбрионы свиньи, полученные *in vitro* эмбрионы крупного рогатого скота.

Основной принцип витрификации заключается в том, что при охлаждении раствора, содержащего значительное количество криопротекторов, таких как, например, диметилсульфоксид (ДМСО), этиленгликоль (ЭГ) и сахароза, вода из жидкой фазы переходит в твердую без формирования кристаллов льда. Однако осмотические и цитотоксические эффекты, вызванные высокой концентрацией криопротекторов, могут негативно влиять на уровень выживания ооцитов и эмбрионов. Снижение концентрации криопротекторов может быть достигнуто в случае обеспечения сверхвысокой скорости охлаждения витрифицируемого объекта. Современные методы витрификации с доказанной высокой эффективностью основываются на принципе охлаждения минимального объема (*minimum volume cooling*; MVC), когда общий объем образца составляет менее 0,1 мкл. Данный принцип соблюдается при использовании таких носителей открытого типа, как Cryotop, Cryoloop, Cryoleaf, полусоломинки (6). В частности, в репродуктивной медицине для криоконсервации яйцеклеток и эмбрионов человека широко используется Cryotop® (Kitasato Supply Co., Japan). В сельскохозяйственной практике носитель открытого типа был использован в производственном испытании при индивидуальной витрификации IVP эмбрионов крупного рогатого скота на большом поголовье с привлечением нескольких операторов (7). Выживание эмбрионов после отогревания составляло до 100%, а показатели уровня стельности реципиентов и рождения молодняка не уступали полученным при трансплантации свежих эмбрионов. Однако носители открытого типа в основном предназначены для криоконсервации ограниченного количества ооцитов или эмбрионов, что существенно усложняет процедуру витрификации при работе с эмбрионами многоплодных животных, требующих для трансплантации от нескольких штук до нескольких десятков эмбрионов одновременно, в частности, свиней. Для крупного рогатого скота, когда при налаженной технологии количество получаемых *in vitro* эмбрионов может составлять несколько десятков за один цикл, носители открытого типа также не получают широкого практического применения. Для одновременной витрификации группы эмбрионов было предложено использовать сеточки для электронной микроскопии (8) или бумажный носитель, который мог адсорбировать часть витрификационного раствора (9). Однако при использовании этих носителей группа эмбрионов должна быть обработана в «рассыпную» за очень короткий промежуток времени в растворах эквilibрации и витрификации, имеющих высокую вязкость. Это технически трудно выполнимо и ставит эффективность витрификации в зависимость от уровня

мастерства отдельного оператора.

В 2012 году был предложен новый метод витрификации в полых волокнах (hollow fiber vitrification; HFV) с использованием в качестве носителя триацетат целлюлозных полых волокон, имеющих внутренний диаметр 185 мкм, толщину стенок волокна 15 мкм, диаметр пор 7,5 нм (10). Полые волокна использовали для криоконсервации групп свиных (до 20 шт.) и мышинных (до 40 шт.) эмбрионов. При использовании данного носителя предположительно снижался уровень механического воздействия на эмбрионы, снижалось токсическое воздействие высокой концентрации криопротекторов за счет стандартизации и упрощения обработки группы эмбрионов, соблюдался принцип MVC. При этом группа эмбрионов обрабатывалась как единое целое, что значительно упрощало процедуру витрификации. Было показано, что HFV метод эффективен при криоконсервации таких криочувствительных объектов, как партеногенетические морулы свиные (10, 11).

Основным недостатком триацет целлюлозного полого волокна является его хрупкость в условиях жидкого азота. Поэтому для длительного хранения эмбрионов, витрифицированных в полом волокне, было сконструировано устройство для витрификации, состоявшее из отрезка полого волокна, прикрепленного к канюле для периферических вен при помощи эпоксидного клея. На канюлю в качестве чехла крепили отрезок телескопической пластиковой соломинки. Все устройство размещали в криобирке. По утверждению авторов конструкция была достаточно громоздкой и сложной в исполнении (10).

Нами была разработана новая простая и компактная конструкция устройства (12). Целью данной работы было определение эффективности метода HFV для витрификации полученных *in vitro* эмбрионов крупного рогатого скота при использовании раствора отогревания комнатной температуры (22–24°C). Данная модификация может способствовать более широкому применению метода в сельском хозяйстве.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе кроме оговоренных случаев были использованы реактивы фирмы “Sigma-Aldrich” (США). Ооциты выделяли из антральных фолликулов яичников крупного рогатого скота, полученных на мясокомбинате. Ооциты с равномерно гранулированной ооплазмой, окруженные многослойным кумулюсом (КОК), инкубировали в среде М-199 с добавлением пирувата натрия, L-глутамина, L-цистеина, хорионического гонадотропина, фолликулостимулирующего гормона, эстрадиола-17β и 10% фетальной сыворотки крови крупного рогатого скота в течение 22–23 часов в CO₂-инкубаторе в атмосфере с 7% CO₂ при температуре 38,5°C. После созревания КОК переносили в заранее эквивилиброванную среду оплодотворения TALP-Fert (13). Сперматозоиды для оплодотворения выделяли из криоконсервированного семени быка по методу swim-up. Через 18–20 часов после начала оплодотворения предполагаемые зиготы освобождали от клеток кумулюса и переносили в модифицированную среду SOF (14). Культивирование эмбрионов проводили при температуре 38,5°C в атмосфере 5,6% CO₂,

5,7% O₂, 88,7% N₂. День проведения IVF считали нулевым. Для проведения экспериментов использовались морфологически нормальные расширенные и нерасширенные бластоцисты крупного рогатого скота в возрасте 7 суток.

Витрификационное устройство было сконструировано из отрезка триацетат целлюлозного полого волокна длиной 2–2,5 см, имеющего внутренний диаметр 200 мкм, надетого на конусообразный кончик стеклянного капилляра диаметром 150–180 мкм. Защитный чехол из пластика крепился непосредственно на стеклянный капилляр. Витрификацию эмбрионов проводили в соответствии с методом, предложенным Масашиги Куваема с соавт. (15). Отобранные бластоцисты инкубировали в двух сменах среды TALP-HEPES (16) с 20% фетальной сыворотки крови крупного рогатого скота в течение 10 минут. Затем бластоцисты переносили в раствор эквilibрации, содержащий по 7,5% ЭГ и ДМСО, и загружали в устройство для витрификации группами по 5–10 эмбрионов. Общее время инкубации в растворе эквilibрации составляло 5 минут. Затем полое волокно, содержащее бластоцисты, переносили в раствор витрификации, содержащий 0,5 М сахарозы и по 15% ЭГ и ДМСО, и инкубировали в течение 60 секунд, после чего волокно погружали в жидкий азот. Затем на полое волокно опускали защитный чехол и полностью погружали устройство для витрификации в жидкий азот.

При отогревании эмбрионов полое волокно переносили из жидкого азота в среду отогревания, содержащую 1 М сахарозы. Температура раствора отогревания для первой экспериментальной группы составляла 39°C, а для второй группы была комнатной (22–24°C). Кончик стеклянного капилляра отламывали, а волокно инкубировали в течение 60 секунд. Затем полое волокно последовательно инкубировали в растворе разбавления с 0,5 М сахарозы и двух сменах TALP-HEPES с 20% фетальной сыворотки. В последнем растворе бластоцисты выгружали из полого волокна. Затем эмбрионы переносили в SOF и инкубировали в течение 72 часов. Уровни выживания и выхода эмбрионов из блестящей оболочки регистрировали через 24 и 72 часа после отогревания соответственно. Результаты представлены в виде среднего процента выживших или вылупившихся бластоцист от числа витрифицированных бластоцист ± стандартное отклонение. В оценке полученных результатов использовался t-критерий Стьюдента ($<0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объем образца, содержавшего 5–10 бластоцист крупного рогатого скота внутри волокна, составлял 0,024–0,030 мкл. После 24 часов инкубирования в группе эмбрионов, отогретых при 39°C, уровень выживания составлял $88.73 \pm 5.99\%$ (64/73; 7 повторов), а в группе эмбрионов, отогретых при 22–24°C – $82.65 \pm 11.62\%$ (159/191; 14 повторов). Уровень выхода бластоцист из блестящей оболочки через 72 часа культивирования составлял $64.74 \pm 12.74\%$ и $53.77 \pm 22.37\%$ в каждой из групп соответственно. По обоим показателям статистически достоверных отличий между группами выявлено не было. Возможно, что малый объем витрифицируемого образца в просвете полого волокна обеспечивает достаточно высокие скорости охлаждения и отогревания, предотвращающие возможность девитрификации и

рекристаллизации. В свою очередь использование раствора отогревания при комнатной температуре может уменьшить негативное воздействие на эмбрионы высокой концентрации таких криопротекторов, как ДМСО.

При хранении в жидком азоте в течение 2–12 месяцев эмбрионов, витрифицированных с использованием разработанного устройства, механических повреждений и потерь полых волокон не наблюдалось.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанное устройство для витрификации является достаточно простым в изготовлении. Устройство надежно защищает полые волокна, содержащие эмбрионы, от механических повреждений в условиях жидкого азота. Отогревание витрифицированных в полых волокнах IVP эмбрионов крупного рогатого скота при комнатной температуре не оказывает существенного влияния на выживание и потенциал развития эмбрионов по сравнению с отогреванием при 39°C. В целом разработанное устройство и модификация режима отогревания эмбрионов могут способствовать более широкому применению метода витрификации в сельском хозяйстве.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Whittingham, D.G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature*. 1971;233:125–126.
- 2 Whittingham, D.G. et al. Survival of mouse embryos frozen to –196 and –269 °C. *Science*. 1972;178:411–414.
- 3 Wilmut, I. Effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during cooling and thawing. *Life Sci*. 1972;11:1071–1079.
- 4 Wilmut, I., Rowson, L.E.A. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* 1973;92:686–690.
- 5 Willadsen, S.M. et al. Deep freezing of sheep embryos. *J. Reprod. Fertil.* 1976;46:151–154.
- 6 Sarogusty, J., Arav, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*. 2011;141:1–19.
- 7 Gutnisky, C. et al. Evaluation of the cryotech vitrification kit for bovine embryos. *Cryobiology*. 2013;67:391–393.
- 8 Park, S.-P. et al. Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids. *Human Reproduction*. 1999;14:2838–2843.
- 9 Kim, Y.M. et al. Successful vitrification of bovine blastocysts on paper container. *Theriogenology*. 2012;78:1085–10931.
- 10 Matsunari, H. et al. Hollow fiber vitrification: A novel method for vitrifying multiple embryos in a single device. *J. Reprod. Dev.* 2012;58:599–608.
- 11 Nagashima, H. et al. Direct comparison of the hollow-fiber vitrification and conventional vitrification methods. Program and Abstracts. IFFS/JSRM International Meeting 2015. Yokohama, Japan, 26–29 April, 2015; O-060.
- 12 Маленко, Г.П. с соавт. Заявка на изобретение от 30.10.2014, регистрационный № 2014143797.
- 13 Parrish, J.J. et al. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*. 1986;25:591–600.
- 14 Tervit, H.R. et al. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil.* 1972;30:493–497.
- 15 Kuwayama, M. et al. Highly efficient vitrification method for cryopreservation

of human oocytes. Reprod. Biomed. Online. 2005;11:300–308.

16 Bavister, B.D., Yanagimachi, R. *The effects of sperm extract and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster sperm in vitro. Biol. Reprod.* 1977;16:228–237.

619:616-098:57.83.13

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ
ТЕРМОЛАБИЛЬНОГО ТОКСИНА В СУПЕРНАТАНТЕ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР ЭПИЗООТИЧЕСКИХ ШТАММОВ
*ESCHERICHIA COLI***

О.Н. НОВИКОВА, Ю.В. ЛОМАКО, Л.А. АМОСОВА, И.В. ЗУБОВСКАЯ

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского»,
г. Минск, РБ*

Поступила в редакцию 19.08.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Эшерихиоз (колибактериоз) — остропротекающая инфекционная болезнь молодняка животных всех видов, включая птиц. *Escherichia coli* относится к комменсалам, обитающим в кишечнике. Большинство штаммов не патогенны для человека и животных, однако некоторые могут вызывать диарею. В зависимости от наличия факторов патогенности и взаимодействия со слизистой оболочкой кишечника, клиническим проявлением выделяют энтеротоксигенные кишечные палочки (ЕТЕС), энтероинвазивные (ЕІЕС), энтеро-патогенные (ЕРЕС) и энтерогеморрагические (ЕНЕС) [1]. Диарея, вызванная энтеротоксигенными кишечными палочками (ЕТЕС), является основным инфекционным заболеванием новорожденных телят и поросят [2].

Энтеротоксигенные кишечные палочки продуцируют два основных фактора вирулентности:

- фактор колонизации, за счет которого происходит прилипание ЕТЕС к энтероцитам тонкого кишечника, причем адгезия не сопровождается воспалительной реакцией;

- токсический фактор: после колонизации слизистой кишечника штаммы ЕТЕС продуцируют термолабильные (LT) и/или термостабильные (ST) энтеротоксины, вызывающие секрецию сока и электролитов, приводящие к водянистой диарее. ЕТЕС не внедряются в слизистую оболочку кишечника [3].

Итак, ЕТЕС штаммы классифицируют по их способности продуцировать LT и/или ST. ST является низкомолекулярным белком, обладающим свойством мимикрии. Т.е. он встраивается в клетку (имеет аналогичные рецепторы) подобно нативному внутрикишечному гормону гуанидину, который активирует гуанилатциклазу.

LT функционально аналогичен холерному токсину и состоит из пяти В-субъединиц и одной активной субъединицы А. Субъединицы В облегчают проникновение в клетку субъединицы А, что активирует аденилатциклазу, затем происходит увеличение концентрации цАМФ, что приводит к увеличению секции хлоридов и воды и уменьшению реабсорбции натрия. Просвет кишечника наполняется жидкостью и развивается диарея. LT является антигеном и при попадании в организм стимулирует выработку нейтрализующих

антител. ST практически лишен иммуногенных свойств [4,5].

Таким образом, наличие энтеротоксигенных штаммов необходимо учитывать при конструировании вакцин против колибактериоза. Известно, что такие вакцины обладают доказанным профилактическим эффектом [6, 7].

Нами была поставлена задача определить степень токсинообразующих свойств эпизоотических штаммов ETEC.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Бактериальные штаммы. В работе использовали эпизоотические штаммы K88ав,ас (КМИЭВ-B160), K88-O115 (КМИЭВ-B104). Штамм K88ав,ас (КМИЭВ-B160) обладал гемолитической активностью на кровяном агаре.

Подготовка бактериальной культуры. Бактерии *E. coli* K88 выращивали на МПА при температуре 37⁰С в течение 24 часов, затем делали смыв физиологическим раствором и с помощью денситометра (Biovat, UE) доводили концентрацию до 1×10⁹ микробных клеток/мл. 1 мл бактериальной взвеси вносили в 10 мл среды Мюнделя [8] и культивировали при температуре 37⁰С. За 2 часа до завершения культивирования в бульонную культуру добавляли линкомицин (45 мкг/мл), по завершении культивирования бульонную культуру центрифугировали при 8000g в течение 12 минут. Полученный супернатант фильтровали через стерилизующие мембраны (0,22мкм, Millex[®] GP). Бактериальный супернатант использовали для количественного определения ЛТВ с помощью GM₁ –ИФА.

Получение гипериммунной антисыворотки против ЛТВ. Кроличьи антиЛТВ гипериммунные сыворотки получали однократной подкожной иммунизацией кроликов ЛТВ стандартом (Sigma, E8656) в смеси с адьювантом ИЗА 206 (*Montanide*), содержание ЛТВ в образце составило 25мкг/мл. Через месяц после заключительной иммунизации кроликов тотально обескровливали. Сыворотку прогревали при температуре 56⁰С в течение 30 минут и в GM₁-ИФА изучали ее специфическую активность.

Определение количественного содержания ЛТВ в супернатанте бактериальных культур. Микропланшеты сенсibilизировали GM₁ (Sigma, G7641) 0,5мкг/мл в течение 18 часов при температуре 20⁰С. Стандарт ЛТВ разводили в фосфатно-буферном растворе. Далее различные концентрации ЛТВ и каждый образец бактериального супернатанта вносили в соответствующие лунки в объеме 100 мкл. В качестве отрицательного контроля в лунки добавляли среду Мюнделя в разведении 1:1 (100мкл/лунка). Инкубировали в течение 60 минут при температуре 37⁰С. Затем добавляли кроличьи гипериммунные сыворотки против ЛТВ в разведении 1:64 в объеме 100 мкл, инкубировали 60 минут при температуре 37⁰С. Меченые антитела козы к IgG кролика (Thermo scientific, 31463) в разведении 1:5000 вносили в объеме 100мкл на 60 минут при температуре 37⁰С. После каждого этапа реакции лунки промывали не менее 3-х раз фосфатно-буферным раствором с Твином. На заключительном этапе вносили ТМВ-субстрат (Applichem, A3840) 100 мкл/лунка. Реакцию останавливали 2М H₂SO₄ и результаты учитывали на спектрофотометре (Bio-Rad: Mark Micropore Reader) при длине волны 450нм.

Статистическую обработку полученных цифровых данных проводили с помощью критерия Стьюдента [9] для независимых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты постановки ГМ₁- ИФА. По результатам количественной раститровки стандарта LTB построен калибровочный график (рисунок 1).

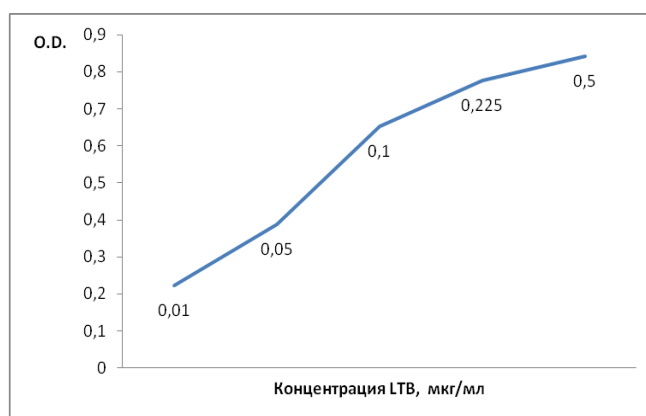


Рисунок 1 – Калибровочный график LTB

К88ав,ас(КМИЭВ-160), К88-О115 (КМИЭВ-104) была дана на основании результатов оптической плотности (таблица 1).

Таблица 1 – Продукция LTB в бактериальном супернатанте ЕТЕС

ЕТЕС	OD	Количество LTB(мкг/мл)
К88ав, ас(КМИЭВ-В160)	0,339±0,05	0,04
К88-О115(КМИЭВ-В104)	0,145±0,03	менее 0,01
отрицательный контроль	0,068±0,002	–

Примечание – OD – оптическая плотность

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан иммунологический метод – GM₁-ИФА, который дает возможность количественной оценки ЛТВ в супернатанте ЕТЕС. Предложенный метод является перспективным для оценки фенотипических энтеротоксигенных свойств эпизоотических штаммов *E. coli* в сравнительном аспекте, а также предоставляет возможность дозированного внесения ЛТВ при конструировании вакцинных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Chirok, E. *The Pathological Society of Great Britain and Ireland Comparison of rapid methods for detection of heat-labile (LT) and heat-stable (ST) enterotoxin in Escherichia coli*/ E.Chirok, G.Semjen, H.Steinruck // *J. Med. Microbiol.* – 1992. – Vol. 36. – P. 398–402.
- 2 Martin, M.J. *Enterotoxigenic Escherichia coli strains bind bovine milk gangliosides in a ceramide-dependent process*/ M.J. Martin, S. Martin-Sosa, J.M. Alonso, P.Hueso // *Lipids*.– 2003. – Vol. 38.– №7. – P. 761–768.
- 3 <http://www.gastroscan.ru/handbook/118/3200>
- 4 Rajkhowa, S. *Detection of heat-stable and heat-labile enterotoxin genes of Escherichia coli in diarrhoeic faecal samples of mithun (Bos frontalis) calves by polymerase chain reaction* / Rajkhowa S, Hussain I, Rajkhowa C.// *J. Appl. Microbiol.*– 2009. – Vol. 106. – №2. – P. 455–458.
- 5 Turner, S.M. *Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic Escherichia coli*/ Turner S.M., Scott-Tucker A., Cooper L.M. // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2006. – Vol. 263.– №1. – P. 10–20.
- 6 Sugiharto, S. *Effect of bovine colostrum feeding in comparison with milk replacer and natural feeding on the immune responses and colonisation of enterotoxigenic Escherichia coli in the intestinal tissue of piglets* / Sugiharto S., Poulsen A.S., Canibe N., Lauridsen C.// *Br J Nutr.* – 2015. – Vol. 113.– №6. – P. 923–934.
- 7 Morimoto, K. *Effect of enterotoxigenic Escherichia coli vaccine on innate immune function of bovine mammary gland infused with lipopolysaccharide* //Morimoto K., Kanda N., Shinde S., Isobe N.J. // *Dairy Sci.* – 2012. – Vol. 95. – №9. – P. 5067–5074.
- 8 Randall, L.P., Wray, C., McLaren, I.M. *Studies on the development and use of a monoclonal sandwich ELISA for the detection of verotoxic Escherichia coli in animal faeces*.// *Vet. Rec.*– 1997.–Vol.140.– P. 112–115.
- 9 Лакин, Г.Ф. *Биометрия* / Г.Ф. Лакин //–М.– «Высш. школа».–1980.–293с.

УДК 636.52/58.083:636.085.16

АДЬЮВАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ХИТОЗАНА ПРИ КОНСТРУИРОВАНИИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ И ПРОТИВОВИРУСНЫХ ВАКЦИН

А.И. АЛБУЛОВ¹, М.А. ФРОЛОВА¹, В.П. ВАРЛАМОВ¹, А.В. ГРИНЬ¹,
Ж.Ю. МУРАДЯН¹, П.П. КРАСОЧКО², В.П. КРАСОЧКО²

¹ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», г. Щелково, РФ

²УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, РБ

Поступила в редакцию 09.06.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы наблюдается возрастание интереса исследователей различных стран к использованию хитозана при конструировании вакцин. При этом хитозан используется как в качестве сорбента антигена, так и стимулятора поствакцинального иммунного ответа (1, 2). Ряд работ выполнен по включению модификатов хитозана в качестве адьюванта в вакцины против листериоза, псевдомоноза, бруцеллеза, туберкулеза, ящура, гриппа и других инфекций (3–5). Имеется опыт успешного включения нанохитозана для повышения иммунного ответа при конструировании бруцеллезных вакцин (6).

Целью настоящих исследований является изучение адьювантных свойств различных модификаций хитозана на модели инактивированной вакцины против ротавирусной инфекции, колибактериоза и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Накопление ротавирусов проводили на культуре клеток СПЭВ в среде Игла до титра 7,0 lg ТЦД 50/мл эшерихии культивировали на мясопептонном агаре до титра микробных тел 5млрд/мл. После инаktivирования теотропином в культуральные жидкости с антигеном вносили хитозан различных препаративных форм до конечной концентрации 0,25%, тщательно перемешивали и вводили внутримышечно белым крысам в дозе 0,5 мл. Через 7 дней животных тотально обескровливали и в сыворотке крови определяли наличие антител к ротавирусу в РНГА, к эшерихиям – в РА. Для контроля использовали алюмокалиевые квасцы в общепринятой концентрации.

Накопление вируса инфекционного ринотрахеита проводили на культуре клеток МДБК с использованием роллерного культивирования. В работе использовали штамм «КМИЭВ-V123» с инфекционной активностью 6,5 lg ТЦД 50/мл. Инаktivацию вируса проводили с помощью теотропина в 0,2% концентрации. Иммунный ответ на введение вируса ИРТ изучали на телятах (45 голов) по 5 телят в группе. В качестве иммуностимулятора ис-

пользовали полиоксидоний, гидроокись алюминия, сапонин, эмульсиген, Мантанид Иза 15, хитозана сукцинат, которые вводили совместно с инаktivированным вирусом ИРТ двукратно с интервалом в 21 день в объеме 1,0 мл в различных дозах и концентрациях. Контрольной группе животных инаktivированный вирус ИРТ не вводили. Кровь у животных брали до иммунизации, через 14 и 45 дней после иммунизации.

Наличие антител к вирусу ИРТ определяли в РНГА с использованием эритроцитарных диагностикумов. РНГА ставили путем разведения исследуемых сывороток крови в растворителе микротитраторе системы Такачи в объеме 0,025 мл в разведениях от 1:2 до 1:256. Положительной считали реакцию при титре исследуемой сыворотки 1:16 и выше при агглютинации жидкого эритроцитарного антигена на 4+ – 2+.

В опытах использовали препараты хитозана производства ВНИТИБП-ЗАО «Биопрогресс» (г. Щелково Московской области): хитозан высокомолекулярный и низкомолекулярный, сукцинат и глутамат хитозана.

Исследования проведены в условиях РУП «Института экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», НИИ прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии, УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» и ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проверка адъювантных свойств различных модификаций хитозана на модели инаktivированной вакцины против ротавирусной инфекции показала, что наибольшей активностью по отношению к ротавирусу обладают хитозан низкомолекулярный и глутамат хитозана (титры антител к вирусу после иммунизации составили 1:16).

Титры антител к *E. coli* после использования в составе колибактериозной вакцины различных хитозановых адъювантов были самыми высокими с сукцинатом хитозана и низкомолекулярным хитозаном.

Алюмокалиевые квасцы показали низкую адъювантную активность к вирусному антигену и высокую к бактериальному, однако сильная местная воспалительная реакция, образование язв и некрозов делают их применение нецелесообразным. До иммунизации у крыс титр антител к ротавирусу и эшерихиям отсутствовал (таблица 1).

Изучение титров антител вируса ИРТ в опытах на телятах при использовании различных адъювантов показало, что наиболее эффективными адъювантами являются сукцинат хитозана и Иза-15 (уровень поствакцинальных антител к вирусу ИРТ до 5,33 log₂).

Таблица 1 – Титры антител к ротавирусу и эшерихиям у крыс после использования различных адъювантов

№ п\п	Адъювант	Титр антител		
		к ротавирусу	к E-coli K 88	к E-coli A 20
1	хитозан глутамат	1:16	1:32	1:64
2	хитозан сукцинат	1:8	1:32	1:128
3	хитозан высокомолекулярный (ММ 495 кДа, СДА 81%)	1:8	1:32	1:32
4	хитозан низкомолекулярный (ММ 80 кДа, СДА 87%)	1:16	1:128	1:256
5	алюмокалиевые квасцы	1:4	1:64	1:128
6	без адъюванта	1:8	1:8	1:2

Таблица 2 – Титры антител к вирусу инфекционного ринотрахеита у телят после использования различных адъювантов

До иммунизации	Через 14 дней	Через 45 дней
1-е взятие крови (перед иммунизацией)	2-е взятие крови (вторая иммунизация)	3-е взятие крови (14 дней после второй иммунизации)
опытная группа 1 полиоксидоний 250 мкг		
3±0	3,6±0,33	3,6±0,33
опытная группа 2 полиоксидоний 500 мкг		
4,33±0,33	5±0,58	4,67±0,67
опытная группа 3 гидроксал 0,6%		
3,67±0,33	4,33±0,33	5±1,00
опытная группа 4 гидроксал + сапонин		
3,33±0,33	4,33±0,67	4,67±0,88
опытная группа 5 10% эмульсиген		
3,5±0,29	4,25±0,25	4,5±0,5
опытная группа 6 Иза 15		
3,75±0,48	4,5±0,5	6±0,41
опытная группа 7 хитозана сукцинат 0,5%		
3,33±0,33	3,67±0,33	5,33±0,33
опытная группа 8 хитозана сукцинат 0,25%		
3±0	4,67±0,33	4,33±0,67
опытная группа 9 вирус ИРТ без адъюванта		
4±0,41	4,5±0,50	5±0
контроль		
3±0,57	3±0	3,3±0,33

Высокий уровень антител был определен при использовании гидроксала (до $5,0 \log_2$). Однако использование гидроксала с сапонином, полиоксидонием (500 мкг/голову) и 10% эмульсигеном позволило повысить уровень антител только до $4,67 \log_2$ и $4,5 \log_2$ соответственно, а с полиоксидонием (250 мкг/голову) – до $3,6 \log_2$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о преимущественном использовании различных препаративных форм хитозана в качестве адъюванта при изготовлении противовирусных и антибактериальных вакцин по сравнению с известными адъювантами.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Закутский, Н.И. Применение новой инактивированной вакцины против инфекционного ринотрахеита КРС/ Н.И. Закутский, В.И. Жестерев, И.Р. Вишняков [и др.]. // «Вестник Рос. Академии с.-х. наук. – 1999. – № 5. – С. 66–68.
- 2 Албулов, А.И. Перспективы использования хитозана в производстве вакцин /А.И. Албулов, А.Я. Самуйленко, В.П. Варламов [и др.]. //Матер. Междунаучно-практич. конференции «Роль ветеринарной науки и практики в эффективном развитии животноводства». Алматы. – 2012. – С. 62–67.
- 3 Okawa, Y., Kobayashi, M., Suzuki, M. Comparative study of protective effects of chitin, chitosan, and N-acetyl chitohexaose against *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria monocytogenes* infections in mice / Biol Pharm Bull. 2003. yun. – 26(6). – P. 902–904.
- 4 Chang, N. Comparison of adjuvant efficacy of chitosan and aluminum hydroxide for intraperitoneally administered inactivated influenza H5 N1 vaccine DNA / N. Chang, X. Li, Y. Liang, B. Peng, F. Fang, Z. Chen, //Cell Biol. – 2010. – V. 29. – P. 563–569.
- 5 Маркушин, С.Г. Сравнительное изучение адъювантных свойств различных форм хитозана при мукозальной вакцинации живой и инактивированной гриппозными вакцинами / С.Г. Маркушин, А.Д. Переверзев, И.Б. Коптяева, Г.Г. Кривцов, А.С. Сухно // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2010. – №5. – С.82–85.
- 6 Allison, C. Rice-Ficht Good or Bad Brucella Vaccine: It's All in the Delivery Brucellosis / Jnt. Research. Con. –2011. – P.15.

УДК 619:616.98:578.83.31-076-084.] :636:612.017.11/12

**СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К КОНСТРУИРОВАНИЮ ВАКЦИН
ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ВИРУСНЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ И
ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ ТЕЛЯТ**

П.А. КРАСОЧКО

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышедесского»,
Минск, РБ*

Поступила в редакцию 15.07.2015 г.

Современное ведение мясного и молочного скотоводства, сопровождающееся концентрацией поголовья на небольшой площади, комплектованием животноводческих ферм и комплексов одновозрастными и одновидовыми животными с генетическим потенциалом, приближенным к однородному, сопровождается быстрым распространением инфекционных заболеваний, которые поражают различные половозрастные группы животных.

Среди болезней крупного рогатого скота пневмоэнтериты наносят огромный экономический ущерб животноводству. Возбудителями таких инфекций являются вирусы, относящиеся к семействам герпесвирусов – вирус инфекционного ринотрахеита (ИРТ), парамиксовирусов – вирусы парагриппа-3 (ПГ-3), респираторно-синтициальный вирус (РСВ), флавивирусов – вирус диареи – болезни слизистых (ВД), аденовирусов, рота- и коронавируса и т.д. Это так называемые «малые» инфекции, которые у здоровых животных с нормальным функционированием иммунной системы протекают бессимптомно без выраженных клинических признаков, или животные вообще не переболевают данными инфекциями. Особенно тяжело болеют животные, когда в патологический процесс вовлекается 2 и более вирусов, то есть возникает смешанная или ассоциативная инфекция. Течение пневмоэнтеритов развивается в две фазы: первая – вирусная фаза, вторая – бактериальная. При тяжелом течении вирусной фазы инфекции наряду с поражением чувствительных клеток наступает значительное угнетение клеточного и гуморального звеньев иммунитета, на фоне чего условно-патогенная микрофлора активизируется и у животных развивается «энзоотическая пневмония», приводящая к значительному отходу заболевших животных, снижению их продуктивности. Особенностью распространения вирусов инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, респираторно-синтициальной инфекции является то, что данные возбудители у молодняка до 1 месяца могут вызывать энтериты, у более старших животных – респираторные заболевания, а у взрослых половозрелых коров и быков – нарушение воспроизводительной функции. Кроме того, вирус парагриппа-3 широко распространен у телят старше месячного возраста при нарушениях технологии выращивания, т.е. при стрессовых воздействиях на организм, вызывая поражения дыхательных путей, а рота- и коронавирусы – у новорожденных телят вызывают тяжело протекающие энтериты [1, 3].

По тропизму все вышеуказанные возбудители могут репродуцироваться в клетках респираторного и желудочно-кишечного тракта, половых органах, иммунокомпетентных клетках, то есть они пантропны. Это обуславливает их высокую контагиозность и тяжесть течения болезни [2, 4].

Одним из пусковых механизмов поражения животных инфекционными заболеваниями в условиях современной промышленной технологии является снижение иммунологической реактивности организма, которая вызывается рядом факторов – недоразвитостью иммунной системы молодняка (первичный иммунодефицит), пищевые токсикозы, недостаточное и несбалансированное по различным компонентам кормление, а также сильное стрессовое воздействие – так называемый «технологический стресс», обусловленный современной технологией производства продукции животноводства. Составляющими современной промышленной технологии, способствующие вызвать стрессовые воздействия на организм животных, являются безвыгульное и безвыпасное содержание животных, транспортировка, изменение микроклимата, формирование больших групп животных, малый фронт кормления, интенсивная эксплуатация. Все такие факторы отрицательно отражаются на иммунной системе и обменных процессах организма животных, что приводит к значительному снижению устойчивости к инфекционным заболеваниям, особенно к заболеваниям, возбудителями которых являются условно-патогенные микроорганизмы и вирусы. Угнетенная иммунная система под воздействием вышеуказанных факторов не в состоянии противостоять вирусам-возбудителям даже с невысокой патогенностью. Вирусы-возбудители респираторных инфекций крупного рогатого скота каждый в отдельности, и особенно в ассоциациях, в свою очередь угнетают отдельные звенья иммунной системы – как клеточные, так и гуморальные. При переболевании животных вирусной диареей поражается, в основном, клеточное звено иммунитета – снижается количество и функциональная активность лимфоцитов, угнетается биосинтез антител, снижается концентрация общего белка в сыворотке крови [1, 2, 5, 6].

Важное место в комплексе лечебно-профилактических мероприятий при пневмоэнтеритах телят, вызванных ИРТ, ВД, РС, РСВ, рота- и корона-вирусами, играет специфическая профилактика (пассивная и активная). Однако использование моновакцин в профилактике ассоциаций не всегда дает положительный эффект, т.к. антитела вырабатываются против одного возбудителя, а патологический процесс вызывается ассоциацией вирусов и бактерий. В этой связи заслуживает интерес использование для специфической профилактики ассоциаций вакцин против 2–3 инфекций, что позволит повысить эффективность вакцинных препаратов. Так, в мировой науке и практике накоплен значительный опыт борьбы с вирусными респираторными и желудочно-кишечными заболеваниями молодняка крупного рогатого скота, однако для условий Республики Беларусь и стран СНГ он не всегда приемлем [4].

Цель настоящего исследования – разработать унифицированные технологии изготовления и применения моно- и ассоциированных живых и инаktivированных культуральных вирус-вакцин для профилактики инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, рота- и коронави

русной инфекций крупного рогатого скота.

В комплексе лечебно-профилактических мероприятий при вирусных респираторных и желудочно-кишечных инфекциях крупного рогатого скота специфическая профилактика занимает одно из ведущих мест.

Специфическая профилактика этих инфекций в современных условиях идет по 5 направлениям:

- активная специфическая профилактика живыми моно- и ассоциированными вакцинами;
- активная специфическая профилактика инактивированными моно- и ассоциированными вакцинами;
- активная специфическая профилактика с использованием рекомбинантных штаммов бактерий, имеющих в своем геноме геном вирусов;
- активная специфическая профилактика с использованием маркерных штаммов вирусов;
- пассивная профилактика респираторных и желудочно-кишечных с использованием гипериммунных сывороток и иммуноглобулинов, сывороток реконвалесцентов, молозивных сывороток и иммуноглобулинов.

Вакцинация телят позволяет создать напряженный специфический иммунитет (как местный, так и общий), а также неспецифический противовирусный иммунитет из-за высокой интерферогенной активности некоторых вакцинных штаммов вирусов, обусловленный созданием невосприимчивости к ряду возбудителей, не входящих в вакцину. Такое положение характерно для иммунизации живыми вирус-вакцинами. Постоянная иммунизация как молодняка крупного рогатого скота, так и взрослых животных способствует вытеснению из стада эпизоотических штаммов вирусов вакцинными и тем самым снизить степень инфицированности возбудителями респираторных инфекций. Это относится к таким вирусным инфекциям, как инфекционный ринотрахеит, вирусная диарея, парагрипп-3, респираторно-синцитиальная инфекция.

Но механизм действия при использовании инактивированных вакцин несколько иной. В основном инактивированные вакцины при вирусных инфекциях телят используют для иммунизации глубоко стельных коров с целью создания напряженного колострального иммунитета у телят, для иммунизации племенных животных, которым нежелательно применять живые вакцины, а также на заключительных стадиях оздоровления хозяйств от вирусных инфекций.

К таким вакцинам относятся инактивированные вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота- и коронавирусной инфекций. Проведенные исследования по изучению роли вирусов в возникновении респираторных и желудочно-кишечных инфекций показали, что в чистом виде (в виде моноинфекций) вирусные инфекции встречаются редко – от 0,5 до 15%, тогда как в ассоциациях значительно чаще – до 75–90%. В этой связи иммунизация животных моновакцинами не достигает желаемого профилактического эффекта, т.к. в патологическом процессе играют роль 2–3 возбудителя.

Однако практическим ветеринарным специалистам часто приходится сталкиваться с такой проблемой, как несоответствие компонентов вакцины с этиологической структурой заболеваний, имеющей место в хозяйстве.

В связи с вышеизложенным, нами проведен комплекс исследований по разработке универсальной технологии изготовления живых и инактивированных моно- и ассоциированных вирус-вакцин для иммунизации крупного рогатого скота различного возраста и физиологического состояния, а также принцип стимуляции иммунной системы при вакцинации вирус-вакцинами.

На основании многолетних исследований и литературных данных нами разработана и широко использована в конструировании и выпуске живых и инактивированных моно- и ассоциированных вирус-вакцин против ИРТ, ВД, ПГ-3, РС рота- и коронавирусной инфекций крупного рогатого скота универсальная технология, которая состоит из следующих этапов:

- подбор, селекционирование, и определения антигенной активности вакцинных штаммов вирусов крупного рогатого скота для конструирования вакцин;
- отработка режимов культивирования вирусов для широкомасштабного накопления большого количества вирусного материала;
- отработка методов лиофильного высушивания вирусов для изготовления живых вакцин;
- отработка оптимальных методов инактивации вирусов для конструирования инактивированных вакцин;
- подбор оптимальных адъювантов для конструирования инактивированных вакцин;
- отработка оптимальных доз и соотношений компонентов при конструировании ассоциированных живых и инактивированных вирус-вакцин;
- изучение антигенной активности живых и инактивированных штаммов вирусов на лабораторных и сельскохозяйственных животных;
- изучение иммунологической перестройки организма телят после иммунизации живыми и инактивированными вирус-вакцинами крупного рогатого скота;
- определение иммуногенности живых и инактивированных культуральных вирус-вакцин против вирусных инфекций крупного рогатого скота на лабораторных животных;
- изучение профилактической эффективности живых и инактивированных культуральных вирус-вакцин вирусных инфекций крупного рогатого скота при респираторных и желудочно-кишечных болезнях телят, заболеваний репродуктивных органов коров.

При подборе, селекционировании и определении антигенной активности вакцинных штаммов вирусов – возбудителей пневмоэнтеритов крупного рогатого скота при конструировании вакцин используются изоляты вирусов, выделенные от больных животных на первично трипсинизированных культурах клеток почки эмбриона теленка или тестикул бычка, а в последние годы – перевиваемых культурах клеток (ПТ-линия "Таурис", МДБК, ПТ-80). В качестве питательных культуральных сред применяли среду 199; 0,5% лактальбумина гидролизат; среду Игла; ферментный гидролизат мы-

печных тканей (ФГМС), гомогидролизат. Для изготовления вакцин против ИРТ крупного рогатого скота используются аттенуированные штаммы ТК-А и МВА 2/81, «4016», «Оренбург» и «Молдавский»; вирусной диареи – аттенуированный штамм ВК-№ 28, инактивированной – «Орегон С-24», парагриппа-3 – аттенуированные штаммы ПТК- 45, SF- 4, «Белорусский-9»; ротавирусной инфекции – штамм № 243, «Белорусский -7»; коронавирусной инфекции – «Линкольн», F-17 и «Белорусский-11».

Для накопления и адаптации вакцинных штаммов вирусов ИРТ, ВД, ПГ-3, коронавируса нами использованы первичные клетки почки эмбриона коровы (ПЭК), почки теленка (ПТ, линия «Таурис»); (ПТ-80) и МДБК. Ротавирус адаптировали к перевиваемым линиям клеток почек зеленой мартышки – *Vero*, почки теленка – МДБК, перевиваемые клетки почки поросенка – СПЭВ. В работе нами использованы адаптированные и аттенуированные штаммы вирусов, которые депонированы в Республиканской коллекции микроорганизмов и им присвоены номера: инфекционного ринотрахеита – КМИЭВ – 6, диареи – КМИЭВ – 7, парагриппа-3 – КМИЭВ- 8, ротавирус – КМИЭВ – 3, коронавирус – КМИЭВ – 1.

Для широкомасштабного накопления монокомпонентов вирусов для изготовления вакцин проведено сравнительное культивирование на 1,5-литровых матрасах и на 2–3-литровых роллерах. При этом цитопатическое действие (ЦПД), характерное для вируса ИРТ, наступало через 36–48 час, вируса диареи – 24–36 час, вируса парагриппа-3 – 60–72 час, ротавируса – через 24 час, коронавируса – через 72–96 час. К этому сроку отмечалась полная деструкция клеточного монослоя, его сползание со стекла и наличие в вирусосодержащей жидкости взвеси клеток. Титрация вирусосодержащей жидкости по Риду и Менчу показала, что после культивирования на матрасах титр вируса ИРТ составлял 5,5–6,0 lg ТЦД 50/1,0 мл; вируса диареи – 6,0–6,5 lg ТЦД 50/1,0 мл; вируса парагриппа-3 – 5,0–5,5 lg ТЦД 50/1,0 мл; ротавируса – 7,5–8,0 lg ТЦД 50/1,0 мл; коронавируса – 5,0 lg ТЦД 50/1,0 мл. Но при культивировании на роллерах – титр вируса был выше на 1,5–2,0 lg ТЦД 50/1,0 для каждого вируса.

Изучение антигенной активности адаптированных штаммов вирусов ИРТ, ВД и ПГ-3, рота- и коронавируса на кроликах и телятах в сравнении с исходными штаммами проводилось путем введения кроликам и телятам по 2 мл вирусосодержащей жидкости каждого из вирусов при инфекционном титре 6,0 lg ТЦД 50/мл. Установлено, что адаптация вирусов ИРТ, ВД, ПГ-3, рота- и коронавируса на новых клеточных линиях не влияет на их антигенную активность в сравнении с исходными штаммами. Штаммы не реактогенны, вызывают активную выработку противовирусных антител сельскохозяйственными (телята) и лабораторными (кролики) животными в достаточно высоких титрах – до 4–6 log₂.

Для изготовления живых вакцин, повышения сроков их хранения разработаны методы лиофильного высушивания вакцин. В качестве защитных сред использованы среда ВГНКИ № 3, состоящая из сахарозы, желатозы и агара; а также среды на основе сахарозы и лактальбумина, среды на основе сухого молока. Использование данных защитных сред позволило с наименьшей потерей инфекционной активности проводить высушивание

вакцин.

При изготовлении инактивированных вакцин для инактивации вирусов без снижения антигенной активности наиболее эффективным средством явился теотропин (1,8,3,6– диэндометилен – 1,3,6,8 – тетраазациклодекан) в 0,1–0,2% концентрации. Теотропин в низких концентрациях необратимо инактивирует практически все вирусы животных. Механизм инактивации основан на разрушении нуклеиновых кислот (РНК и ДНК). В концентрациях до 5% не токсичен для млекопитающих и птиц, не раздражает кожные покровы и слизистые оболочки, при аэрозольном применении не вызывает раздражения дыхательных путей.

Для повышения иммунологической эффективности инактивированных вакцин на основании длительных исследований используются эмульсиген в 10% концентрации, Монтанид ИЗА 15 в 15% концентрации, Монтанид ИЗА 206 в 50% концентрации, активированная целлюлоза в 2% концентрации. Их использование позволит на 3–4, 4–6 $\log_2$ повысить уровень поствакцинальных антител по сравнению с введением вируса без адъювантов.

При отработке оптимальных доз и соотношений компонентов при конструировании ассоциированных живых и инактивированных вирус-вакцин в зависимости от возраста и живой массы животного доза вакцины составляет от 2 до 5,0 см³ при двукратном введении с интервалом 21– +28 дней.

При изучении иммунологической перестройки организма крупного рогатого скота после иммунизации живыми и инактивированными вирус-вакцинами установлено, что у всех животных уровень поствакцинальных антител достоверно повышался до 8 $\log_2$, количество Т- и В-лимфоцитов – на 12–25%, иммуноглобулинов – на 10–20% и т.д.

На основании проведенных исследований нами разработаны:

- вирус-вакцина живая культуральная против инфекционного ринотрахеита (профилактическая эффективность – 88,2–91%);
- вирус-вакцина живая культуральная против вирусной диареи (профилактическая эффективность – 91– 96,9%);
- вирус-вакцина живая культуральная против парагриппа-3 (профилактическая эффективность – 88,0–90%);
- вирус-вакцина инактивированная против вирусной диареи (профилактическая эффективность для коров до 100% и для телят – до 95,6%);
- вирус-вакцина инактивированная против инфекционного ринотрахеита (профилактическая эффективность – 91,4–96,4%);
- вирус-вакцина бивалентная живая культуральная против инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи (профилактическая эффективность – 88,0–90,8%);
- вирусвакцина трехвалентная живая культуральная против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и парагриппа-3 (профилактическая эффективность – 95,5–97,1%);
- ассоциированная вакцина против рота- и коронавирусной инфекций новорожденных телят (профилактическая эффективность – 85,0–95,6 %);

- поливалентная инактивированная культуральная вирус-вакцина против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота- и коронавирусной инфекций крупного рогатого скота «Тетравак» (профилактическая эффективность – 93,3 – 95,1%);
- вирус-вакцина инактивированная для профилактики заболеваний репродуктивных органов коров и желудочно-кишечного тракта телят (профилактическая эффективность для коров – 87,5–100%, для телят 93,5% – 95,1%);
- вакцина поливалентная инактивированная вирусно-бактериальная для профилактики заболеваний репродуктивных органов коров и желудочно-кишечного тракта телят (профилактическая эффективность для коров – 100%, 94,9% – для телят).

ВЫВОДЫ

Разработана унифицированная технология изготовления и применения моно- и ассоциированных живых и инактивированных культуральных вирус-вакцин для профилактики инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, рота- и коронавирусной инфекций крупного рогатого скота.

С помощью унифицированной технологии разработано 11 биопрепаратов с профилактической эффективностью от 85 до 100%.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 *Болезни крупного рогатого скота и овец / П.А. Красочко, З.М. Джамбулатов, К.Б. Курбанмагомедов [и др.] – Под общей редакцией доктора ветеринарных наук, профессора П.А. Красочко. – Махачкала, 2007. – 657 с.*
- 2 *Ковалев, Н.А., Красочко, П.А. Вирусы и прионы в патологии животных и человека / Н.А. Ковалев, П.А. Красочко // Минск: Беларуская навука. – 2012. – 426 с.*
- 3 *Современная диагностика инфекционных заболеваний крупного рогатого скота: учебно-методическое пособие / А.Р. Камошенков, П.А. Красочко, Л.С. Кашико, С.М. Грибко, П.П. Красочко: под общей редакцией доктора ветеринарных наук, доктора биологических наук, профессора, академика РАЕН П.А. Красочко // Смоленск: ФГБОУ ВПО «Смоленская ГСХА», 2013. – 84 с.*
- 4 *Сывороточные и вакцинные препараты для профилактики и терапии инфекционных заболеваний животных / Е.В. Сусский, П.А. Красочко, А.П. Медведев, А.А. Вербицкий // Армавир, 2013. – 338 с.*
- 5 *Физиологические основы проявления стрессов и пути их коррекции в промышленном животноводстве: монография / Ф.И. Фурдуй, П.А. Красочко [и др.] // Под ред. П.А. Красочко. – В 2 ч. Ч. 1. – Горки : БГСХА, 2013. – 564 с.*
- 6 *Физиологические основы проявления стрессов и пути их коррекции в промышленном животноводстве: монография / Ф.И. Фурдуй, П.А. Красочко [и др.] / Под ред. П.А. Красочко. – В 2 ч. Ч. 2. – Горки : БГСХА, 2013. – 492 с.*

УДК 619:615.371:616.98:579.842.14

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА КОРПУСКУЛЯРНОЙ
ЭМУЛЬГИРОВАННОЙ И ЕЕ ЭФФЕКТИВНОСТЬ**

А.Ю. ФИНОГЕНОВ, В.В. ЧЕРНЯК, М.М. МИСТЕЙКО,
М.А. АНАНЧИКОВ, А.С. АНДРУСЕВИЧ, О.В. МАЛЬЧИК

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелецкого»
г. Минск, РБ*

Поступила в редакцию 30.06.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Вакцины в сельскохозяйственном производстве использовались и используются для профилактики инфекционных заболеваний очень широко. Одной из важнейших задач современной ветеринарной науки является усовершенствование ранее разработанных и широко применяемых вакцин, а также разработка новых, более дешевых в производстве и с высокой профилактической эффективностью [1, 2, 3, 5, 7].

Одним из компонентов, входящих в состав эмульгированных вакцин, является адъювант. От состава адъюванта в значительной мере зависит время попадания компонентов вакцины в органы иммунитета организма животных, длительность и интенсивность иммунного ответа, срок сохранения иммунитета.

В последние годы в ветеринарной практике используется ряд вакцин против сальмонеллеза сельскохозяйственных животных, в том числе и телят,

как импортных, так и отечественного производства. Однако эти вакцины нуждаются в дальнейшей доработке, направленной на повышение их профилактической эффективности. Несомненно и то, что постоянно проводится научная работа по усовершенствованию применяемых и разработке новых высокоэффективных препаратов, предназначенных для активной профилактики инфекционных заболеваний телят, в том числе и сальмонеллеза за счет использования вновь выделенных штаммов бактерий, аттенуированных штаммов микроорганизмов, вновь разработанных компонентов вакцин (адъюванты, инактиванты, иммуностимуляторы, иммунокорректоры и т.д.) [4, 6, 8, 9, 10].

Таким образом, целью наших исследований являлось конструирование вакцины против сальмонеллеза крупного рогатого скота корпускулярной эмульгированной, ее испытание на лабораторных животных и использование для профилактики сальмонеллеза у телят.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При изготовлении вакцины против сальмонеллеза крупного рогатого скота корпускулярной эмульгированной, предназначенной для профилактики сальмонеллеза у телят в раннем возрасте, применили новый адъювант Montanid ISA 70 VG. В состав вакцины включили штаммы сальмонелл *Salmonella dublin* (КМИЭВ-В 111) и *Salmonella typhimurium* (КМИЭВ - В 112), которые получены из Всероссийского государственного научно-исследовательского института контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов и депонированы в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Накопление бактериальной массы осуществляли, используя плотные и жидкие питательные среды на основе перевара Хоттингера.

Гуморальные антитела и их титр к сальмонеллам определяли, используя сыворотки крови животных и бактериальные антигены, приготовленные из штаммов *Salmonella dublin* и *Salmonella typhimurium* в реакции агглютинации.

Постановку реакции агглютинации осуществляли с использованием пипеточного восьмиканального дозатора в полимерные планшеты для иммунологических реакций с лунками U-образной формы.

Изучение иммуногенности вакцины проводили на белых мышах. Были сформированы 4 опытные и одна контрольная группа. У животных на 7, 14, 21, 30-е сутки после введения вакцины отбирали пробы крови, сыворотку использовали при постановке реакции агглютинации (РА). Следующим этапом провели исследования иммуногенности вакцины на кроликах. Были сформированы 3 опытные и одна контрольная группа кроликов. У кроликов на 14, 21, 28-е сутки после введения вакцины отбирали пробы крови, получали сыворотки крови для постановки реакции агглютинации.

Эффективность вакцины также проверяли на телятах в условиях современного сельскохозяйственного производства. Для испытания вакцины в ОАО «Замощье» Борисовского района Минской области были подобраны три группы телят в возрасте от 7 до 10 дней. У телят в 14, 21, 30-дневном, а затем в 2, 3, 4, 5, 6-месячном возрасте отбирали пробы крови, получали сыворотки крови для постановки реакции агглютинации с антигенами *Salmonella*

dublin и *Salmonella typhimurium* в целях определения титра антител к указанным антигенам, которые входят в состав вакцины.

Для проведения производственных испытаний вакцины в ОАО «Забашевичи» были подобраны две группы телят в возрасте от 7 до 10 дней. Телятам первой группы (опытная) вводили 1,0 мл вакцины внутримышечно в области шеи с содержанием микробных клеток 1 млрд/мл. Телятам второй группы (опытная) вводили 1,0 мл вакцины против внутримышечно в области шеи с содержанием микробных клеток 5 млрд/мл. Телятам второй группы (контрольная) вводили фармолквасцовую концентрированную вакцину против сальмонеллеза телят (производства УП «Витебская биофабрика», РБ) согласно инструкции по применению. Животные в течение опыта содержались в типовом телятнике отдельными группами.

За телятами наблюдали в течение 30 дней после введения вакцины, при этом проводили клинические исследования телят, а также регистрировали наличие вынужденного убоя и падежа опытных и контрольных телят.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты по изучению иммуногенности вакцины с использованием белых мышей приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты постановки реакции агглютинации с сыворотками крови опытных и контрольных белых мышей с антигенами *Salmonella dublin* и *Salmonella typhimurium*

Группа белых мышей	Срок после введения вакцины (сутки)	Титр антител к:	
		<i>Salmonella dublin</i> ($\log_2$)	<i>Salmonella typhimurium</i> ($\log_2$)
I (опытная, 5 голов)	7	5	5
II (опытная, 5 голов)	14	8	8
III (опытная, 5 голов)	21	6	8
IV (опытная, 5 голов)	30	6	7
V (контрольная)	30	4	5

Как свидетельствуют данные, приведенные в таблице 1, титр антител к *Salmonella dublin* составлял на 7 сутки – 5 $\log_2$; 14 сутки – 8 $\log_2$; 21 сутки – 6 $\log_2$; 30 сутки – 6 $\log_2$. А к *Salmonella typhimurium* титр антител был равен на 7 сутки – 5 $\log_2$; 14 сутки – 8 $\log_2$; 21 сутки – 8 $\log_2$; 30 сутки – 7 $\log_2$. В сыворотке крови контрольных мышей титр антител к *Salmonella dublin* был равен 4 $\log_2$, а к *Salmonella typhimurium* – 5 $\log_2$.

Таким образом, введение белым мышам вакцины вызывает иммунный ответ с высоким уровнем гуморальных антител. Результаты постановки реакции агглютинации с сыворотками крови опытных и контрольных кроликов с антигенами *Salmonella dublin* и *Salmonella typhimurium* приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты постановки реакции агглютинации с сыворотками крови опытных и контрольных кроликов с антигенами *Salmonella dublin* и *Salmonella typhimurium*

На 28 день титр антител *Salmonella dublin* у кроликов первой группы

Группа	Сроки исследования кроликов после введения вакцины (сутки):							
	до введения		14		21		28	
	<i>S. dublin</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. dublin</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. dublin</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. dublin</i>	<i>S. typhimurium</i>
I (опытная, 3 головы)	0,33±0,19	0,66±0,2	4,33±1,9	4,33±1,9	4,0±2,32	4,33±1,35	0,33±0,19	4,33±0,97
II (опытная, 3 головы)	0,33±0,19	0,33±0,19	4,0±1,16	4,66±1,55	4,33±1,94	5,0±1,16	4,0±1,74	4,33±1,54
III (опытная, 3 головы)	0,33±0,19	0,66±0,2	5,66±0,77	5,33±0,38	6,66±0,39	6,66±0,39	5,33±0,38	6,66±0,38
IV (контрольная, 3 головы)	0,33±0,19	1,00±0,2	0,33±0,19	1,0	1,0	0	1,0	0,33±0,19

был равен $4,0 \pm 1,16 \log_2$, а к *Salmonella typhimurium* – $4,33 \pm 0,97 \log_2$. У кроликов второй группы титр антител к *Salmonella dublin* был равен $4,0 \pm 1,74 \log_2$, а к *Salmonella typhimurium* – $4,33 \pm 1,54 \log_2$. Кролики третьей группы имели антитела к *Salmonella dublin* в титре $5,33 \pm 0,38 \log_2$, а к *Salmonella typhimurium* – в титре $6,66 \pm 0,38 \log_2$. В контрольной группе кроликов титр антител к *Salmonella dublin* был равен $0,39 \pm 0,19 \log_2$, а к *Salmonella typhimurium* – $1,0 \log_2$. Это практически отсутствие антител, а осаждение бактериальных антигенов при разведении сыворотки 1:2 происходит за счет нормальных антител сыворотки крови.

Введение вакцины кроликам вызывает четкий иммунный ответ у последних с образованием антител к *Salmonella dublin* и *Salmonella typhimurium* в высоких титрах.

Изучение иммунологических свойств вакцины против сальмонеллеза крупного рогатого скота продолжили на телятах в производственных условиях. Данные исследований приведены в таблице 3.

Как свидетельствуют полученные данные, у телят первой группы на 30-й день титр антител к *Salmonella dublin* был равен $7,7 \pm 0,92 \log_2$, а к *Salmonella typhimurium* – $10,9 \pm 0,65 \log_2$.

Таблица 3 – Результаты постановки реакции агглютинации с сыворотками крови опытных и контрольных телят с антигенами *Salmonella dublin* и *Salmonella typhimurium*

Группа	Сроки исследования кроликов после введения вакцины (сутки):							
	до введения		14		21		30	
	<i>S. dublin</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. dublin</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. dublin</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. dublin</i>	<i>S. typhimurium</i>
I (опытная, 10 голов)	0,19±0,53	1,70±0,42	7,00±0,33	8,60±0,96	8,20±0,75	9,70±1,08	7,70±0,92	10,90±0,65
II (опытная, 10 голов)	0,40±0,22	2,00±0,33	9,60±0,83	9,90±1,05	9,30±0,75	11,10±0,60	8,70±1,02	8,80±0,97
III (контрольная, 10 голов)	0,10±0,07	1,0	11,10±0,44	11,20±0,54	10,00±0,66	11,1±0,60	9,40±0,69	9,60±0,53

Продолжение таблицы 3

Группа	Сроки исследования кроликов после введения вакцины (сутки):					
	60		90		120	
	<i>S. dublin</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. dublin</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. dublin</i>	<i>S. typhimurium</i>
I (опытная, 10 голов)	7,8±0,15	7,6±0,3	2,8±0,13	2,6±0,32	2,5±0,29	2,3±0,19
II (опытная, 10 голов)	7,3,4±0,4	7,6±0,3	2,2±0,35	2,8±0,38	3,2±0,37	3,3±0,28
III (контрольная, 10 голов)	7,3±0,41	6,8±0,7	3,0±0,62	2,2±0,45	3,0±0,19	3,5±0,28

Телята второй группы в эти же сроки имели титр антител к *Salmonella dublin* $8,7 \pm 1,02 \log_2$, а к *Salmonella typhimurium* – $8,8 \pm 0,97 \log_2$.

При введении вакцины биофабричного производства у телят контрольной группы на 30-й день титр антител к *Salmonella dublin* был равен $9,4 \pm 0,69 \log_2$, а к *Salmonella typhimurium* – $9,6 \pm 0,53 \log_2$.

При испытании вакцины (содержание микробных клеток 1,0 млрд/мл) на телятах в ОАО «Замощье» Борисовского района Минской области было установлено, что антитела к сальмонеллам вакцинных штаммов определяются в титрах от $7,6 \pm 0,65 \log_2$ до $10,9 \pm 0,69 \log_2$, у телят контрольной группы титр антител к сальмонеллам не превышал $7,33 \pm 0,4 - 9,4 \pm 0,69 \log_2$.

Таким образом, введение телятам вакцины против сальмонеллеза крупного рогатого скота корпускулярной эмульгированной с разной концентрацией микробных клеток (1,0 и 5,0 млрд/мл) вызывает у последних стойкий иммунный ответ с высоким титром антител как к *Salmonella dublin*, так и к *Salmonella typhimurium*, входящих в состав вакцины, причем иммунный ответ у этих телят не ниже, чем у телят, получавших вакцину против сальмонеллеза биофабричного производства.

В целом полученные результаты исследований позволяют сделать вывод, что вакцину против сальмонеллеза крупного рогатого скота корпускулярную эмульгированную можно применять в хозяйствах, неблагополучных по сальмонеллезу, с профилактической целью.

Перед применением вакцины следует проводить ветеринарный осмотр поголовья и прививать только клинически здоровых телят, нетелей, коров. Слабых и больных животных нужно вакцинировать после их выздоровления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как показали проведенные научные исследования, вакцина против сальмонеллеза крупного рогатого скота корпускулярная эмульгированная вызывает у белых мышей, кроликов и телят стойкий иммунитет, который проявляется высоким уровнем гуморальных антител. Разработанная вакцина эффективна и может быть рекомендована для широкого внедрения в ветеринарную практику с целью профилактики сальмонеллеза крупного рогатого скота в хозяйствах, неблагополучных по данному заболеванию.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Максимович, В.В. Сальмонеллез свиней / В.В. Максимович. – Минск: «Ураджай», 1994. – 160 с.
- 2 Загаевский, С.И., Жорницкий, А.Л. Сальмонеллезы животных / С.И. Загаевский, А.Л. Жорницкий. – Киев: «Урожай», 1997. – 144 с.
- 3 Шур, И.В. Заболевания сальмонеллезной этиологии / И.В. Шур. – Москва: «Медицина», 1970. – 304 с.
- 4 Павленко, И.В. Усовершенствование технологии изготовления сухой живой вакцины против сальмонеллеза телят из штамма *SALMONELLA DUBLIN* №160 / В.В. Меньшин, И.В. Бобровская, Л.В. Анисимова, А.А. Нежута // Международный научно-практический журнал «Экология и животный мир». – 2012. – №1. – С. 48–51.
- 5 Гусев, А.А. Обеспечение продовольственной безопасности продуктов животного происхождения в Республике / А.А. Гусев, Е.В. Гусева // Международный научно-практический журнал «Экология и животный мир». – 2012. – №1. – С. 11–17.
- 6 Землянская, Н.И. Клиническая эффективность применения пантолиза в лечении сальмонеллеза телят / Н.И. Землянская // Аграрный вестник Урала. – 2011. – С. 22–24.
- 7 Медведев, А.П. Получение и контроль антигена для гипериммунизации продуцентов сыворотки против сальмонеллеза и пастереллеза крупного рогатого скота / А.П. Медведев, Л.А. Кошнерова // Ветеринарная наука производству / Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского. – Минск, 2009–2010. – С. 30–36.
- 8 Лоцинский, М.Н. Эффективность пероральной иммунизации свиней против сальмонеллеза лизат-антигенами возбудителя / М.Н. Лоцинский, В.В. Субботин // Ветеринарная медицина. – №1. – 2011. – С. 34–36.
- 9 Костенко, Ю.Г. Проблема пищевого сальмонеллеза в России: объективный взгляд и пути решения / Ю.Г. Костенко, М.В. Храмов, А.Д. Давлеев // Все о мясе. – 2012. – №1. – С. 28–31.
- 10 Костенко, Ю.Г. Современные аспекты возникновения пищевого сальмонеллеза / Ю.Г. Костенко, М.В. Храмов, А.Д. Давлеев // Все о мясе. – 2012. – №4. – С. 9–13.

УДК 619:615.371:616.98:579.842.14

**ШТАММЫ САЛЬМОНЕЛЛ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ
ПРИ КОНСТРУИРОВАНИИ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ
САЛЬМОНЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

А.Ю. ФИНОГЕНОВ, В.В. ЧЕРНЯК, М.М. МИСТЕЙКО,
М.А. АНАНЧИКОВ, О.В. МАЛЬЧИК, В.М. ЗУБКОВСКАЯ

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского»,
г. Минск, РБ*

Поступила в редакцию 30.06.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Значительное место в работе ветеринарных специалистов сельскохозяйственных предприятий Республики Беларусь занимает профилактическая работа, которая направлена на предупреждение тех или иных заболеваний сельскохозяйственных животных, в том числе и инфекционных. Среди инфекционных заболеваний молодняка крупного рогатого скота наиболее распространены, особенно в ранний постнатальный период, кишечные инфекции, среди которых сальмонеллез занимает одно из первых мест по распространенности. Возбудители сальмонеллеза, обладая высокой патогенностью поражая телят в ранний период, вызывают тяжелое заболевание со значительным охватом поголовья телят и высокой смертностью, тем самым, принося значительные экономические убытки [1, 2, 3]. Среди профилактических мер, предупреждающих возникновение сальмонеллеза телят, является активная иммунизация последних с использованием вакцин. Вакцины в сельскохозяйственном производстве использовались и используются для профилактики инфекционных заболеваний очень широко.

Одной из важнейших задач современной ветеринарной науки является усовершенствование ранее разработанных и широко применяемых вакцин, а так же разработка новых более дешевых в производстве и с высокой профилактической эффективностью [1, 2, 3, 4, 5, 6].

Видовой состав сальмонелл, вызывающих заболевания у сельскохозяйственных животных, в том числе и у молодняка крупного рогатого скота, весьма широк и отличается большим количеством серотипов [1, 2, 3, 4].

Подбор видов сальмонелл с определенной антигенной структурой и способных культивироваться на простых питательных средах, является весьма актуальной задачей при конструировании вакцин для профилактики сальмонеллеза у телят [1, 2].

Наиболее часто сальмонеллез у телят вызывают *Salmonella enteritidis*, *Salmonella dublin*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella abortus bovis*, *Salmonella anatum*, а также *Salmonella paratyphi B*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhi suis* при возможных контактах с другими видами сельскохозяйственных животных в частности со свиньями [4, 6].

Сохранение стабильных культуральных, биохимических, патогенных

свойств микробных штаммов, входящих в состав вакцин, и их длительное культивирование в лабораторных условиях, является одним из важных моментов при конструировании высокоиммуногенных вакцин. Изменение свойств бактериальных штаммов в течение длительного хранения и культивирования в лабораторных условиях иногда приводит к утрате ими иммуногенных свойств, что не позволяет использовать их в конструировании вакцин.

В связи с выше изложенным, прежде чем использовать бактериальные штаммы в изготовлении вакцин необходимо предварительно изучить их основные свойства.

Таким образом, целью наших исследований являлось изучение морфологических, культуральных, биохимических, патогенных, серологических свойств сальмонелл, штаммы которых использовались при конструировании вакцины и длительное время хранились в условиях лаборатории.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для культивирования бактериальных штаммов сальмонелл использовали стандартное лабораторное оборудование (термостат, центрифуга, РН-метр и т.д.), а также лабораторную посуду, градуированные пипетки, Пастеровские пипетки, чашки Петри.

Ресуспензирование микробных клеток при необходимости проводили с использованием 0,85%-го раствора натрия хлорида. Этот же раствор с добавлением 0,5% формалина использовали для хранения антигенов, приготовленных из бактериальных штаммов сальмонелл. Этот раствор использовали также при постановке РА.

Основные свойства сальмонелл изучали перед длительным хранением и после длительного хранения. Культивирование и накопление бактериальной массы микробных клеток сальмонелл осуществляли, используя плотные и жидкие питательные среды на основе перевара Хоттингера.

С целью определения биохимических свойств сальмонелл использовали стандартные питательные среды с индикаторами для определения сахаров, аммиака, индола и т.д.

Для типизации сальмонелл использовали специфические гипериммунные сыворотки крови животных к штаммам *Salmonella dublin* и *Salmonella typhimurium*, приготовленные в условиях биофабрики, а также полученные от телят и лабораторных животных (кролики, белые мыши).

Бактериальные антигены штаммов *Salmonella Dublin* (КМИЭВ - В111) и *Salmonella typhimurium* (КМИЭВ - В 112) готовили в лабораторных условиях и использовали при постановке РА при определении антигенного состава сальмонелл. Специфические гипериммунные сыворотки использовали при постановке реакции агглютинации.

Постановку реакции агглютинации осуществляли с использованием пипеточного восьмиканального дозатора в полимерные планшеты для иммунологических реакций с лунками U-образной формы.

Чувствительность сальмонелл к антибиотикам устанавливали, используя стандартную методику для чего бумажные диски пропитанные тем или иным антибиотиком, размещали на питательной среде в чашках Петри, а затем вносили микробную взвесь. Степень чувствительности микробных

штаммов определяли по зоне задержки роста микроорганизмов вокруг бумажного диска.

Патогенность штаммов *Salmonella dublin* (КМИЭВ - B111) и *Salmonella typhimurium* (КМИЭВ – B 112) с определением LD₅₀ на белых мышах. Расчет LD₅₀ осуществляли по формуле Г. Кербера в модификации П.И. Ашмарина.

Типизацию сальмонелл проводили согласно «Наставления по применению наборов сальмонеллезных О – комплексных и монорецепторных О - и Н - агглютинирующих сывороток.

Штаммы сальмонелл использовали длительное время и хранили их как в условиях холодильника, так и лиофильно-высушенном виде в течение двух лет.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Штамм *Salmonella dublin* (КМИЭВ - B 111) при идентификации отнесен к виду *Salmonella dublin*, семейству *Enterobacteriaceae*.

Указанный микроорганизм в мазках из бульонной или агаровой культуры, окрашенной по Грамму, красится «Отрицательно», имеет вид полиморфной, короткой, с закругленными концами кокковидной палочки, размером 0,5–1,0×1,5–2,0 мкм и тонкой, нежной с закругленными концами палочки размером 0,7–1,0×1,5–2,5 мкм. Микробные клетки в мазках располагаются одиночно, попарно, скоплениями. Культура *Salmonella dublin* (КМИЭВ – B111) подвижная, спор и капсул не образует. Факультативный анаэроб. В МПБ на основе перевара Хоттингера, в первые 24 часа, дает сплошное помутнение бульона. Образует осадок, который легко разбивается и поднимается со дна пробирки в виде мелких и средней величины хлопьев. Формирует пристеночное кольцо, пленки на поверхности бульона не образует.

На МПА на основе перевара Хоттингера *Salmonella dublin* (КМИЭВ-B111) образует мелкие до 3,0 мм, бесцветные или с серым оттенком, круглые, с ровными краями, выпуклые, влажные, пастообразной консистенции колонии. Имеется в проходящем свете голубоватый оттенок у колоний расположенных ближе к верху пробирки. На среде Эндо растет в виде серо-голубых, прозрачных, круглых колоний, на висмут-сульфитном агаре образует темно-зеленые с ровными краями колонии.

В биохимическом отношении штамм *Salmonella dublin* (КМИЭВ – B111) ферментирует с образованием кислоты и газа глюкозу, мальтозу, манит и сорбит. Образует индол, сероводород, не продуцирует гемолизин и уреазу. Утилизирует цитраты.

Штамм чувствителен к левомицетину, гентамицину, спектомицину, энроксилу (EWS 5), канамицину, флувеквину(флумизолу), окситетрациклину, слабочувствителен к тетрациклину, доксициклину, мономицину, не чувствителен к олеандомицину, кобактану, ристомичину.

Штамм *Salmonella dublin* (КМИЭВ – B111) содержит: соматические антигены (O), 1,9, 12, (Vi) группы D₁; жгутиковые антигены (H) фазы 1 g, p.

При ведении штамма *Salmonella dublin* белым мышам установили, что LD₅₀ равно 52,5 микробных клеток.

Штамм *Salmonella typhimurium* (КМИЭВ – B112) при идентификации отнесен к виду *Salmonella typhimurium*, роду *Salmonella*, семейству *Entero-*

bacteriaceae.

Данный микроорганизм в мазках из бульонной или агаровой культуры окрашенной по Грамму красится «Отрицательно», имеет вид полиморфной, короткой, с закругленными концами кокковидной палочки, размером 0,5–1,5×1,5–2,5 мкм. Микробные клетки в мазках располагаются, одиночно, попарно, короткими цепочками и скоплениями. Культура *Salmonella typhimurium* (КМИЭВ – В112) подвижна, спор и капсул не образует. Факультативный аэроб. В МПБ на основе перевара Хоттингера в первые 24 часа *Salmonella typhimurium* (КМИЭВ – В112) образует помутнение, а затем при дальнейшем росте осадок, который при встряхивании поднимается в виде косички. Формирует пристеночное кольцо, пленки на поверхности бульона не образует.

На МПА на основе перевара Хоттингера *Salmonella typhimurium* (КМИЭВ – В112) образует мелкие до 3 мм колонии, вначале бесцветные, а затем серого цвета, круглые, гладкие, выпуклые, влажные с ровным краем, пастообразной консистенции колонии.

Иногда при рассмотрении колоний в проходящем свете, отмечается у последних голубоватый оттенок. Чаще всего у колоний, расположенных ближе к верху пробирки. На среде Эндо рост в виде серо-голубых, прозрачных, круглых колоний, на висмут-сульфитном агаре образует темно-зеленые с ровными краями колонии.

Штамм *Salmonella typhimurium* (КМИЭВ – В112) ферментирует с образованием кислоты и газа глюкозу, мальтозу, манит, сорбит не ферментирует сахарозу и лактозу. Образует индол, сероводород, не продуцирует гемолизин и уреазу. Утилизирует цитраты.

Штамм *Salmonella typhimurium* (КМИЭВ – В112) содержит: соматические антигены (О), 1, 4, (5), 12 группы В; жгутиковые антигены (Н) фазы I – 1 и фазы II – 1, 2.

Штамм чувствителен к левомецетину, гентомицину, спектомицину, энроксилу (EWRS 5), канамицину, флувеквину (флумизолу), окситетрациклину, слабочувствителен к тетрациклину, доксициклину, мономицину, не чувствителен к олеандомицину, кобактану, ристомичину.

При введении штамма *Salmonella typhimurium* белым мышам LD₅₀ было равно 52,75 микробных клеток.

Штаммы *Salmonella dublin* и *Salmonella typhimurium* при комбинировании вакцины, например, против сальмонеллеза крупного рогатого скота использовались как при хранении в условиях холодильника, так и при лиофилизации. Штаммы хранились в лиофильно-высушенном виде до двух лет. В условиях холодильника при температуре +4 – 6⁰ С штаммы хранились гарантированно до 30 дней с сохранением своих свойств, а при лиофилизации гарантировано до 18 месяцев.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Длительное хранение штаммов *Salmonella dublin* (КМИЭВ-111) и *Salmonella typhimurium* (КМИЭВ-112) в лабораторных условиях как в вегетативном, так и в лиофильно-высушенном виде практически не влияет на микробные клетки, и данные штаммы могут быть использованы для кон-

струирования вакцин также после их длительного хранения в лиофильно-высушенном виде с последующей реанимацией до 18 месяцев.

ЛИТЕРАТУРА

1 Медведев, А.П. Получение и контроль антигена для гипериммунизации продуцентов сыворотки против сальмонеллеза и пастереллеза крупного рогатого скота /А.П. Медведев, Л.А. Кошнерова / Ветеринарная наука – производству/ Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского.– Минск, 2009–2010. – С.30–36.

2 Лоцинский, М.Н. Эффективность пероральной иммунизации свиней против сальмонеллеза лизат-антигенами возбудителя /М.Н. Лоцинский, В.В. Субботин// Ветеринарная медицина.– №1. – 2011. – С. 34–36.

3 Костенко, Ю.Г. Современные аспекты возникновения пищевого сальмонеллеза/ Ю.Г. Костенко, М.В. Храмов [и др.]. Все о мясе. – Всесоюзный научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В.М. Горбатова.–Москва,– 2012. – №4. – С.9–13.

4 Ходр, М.М. Совершенствование метода контроля активности сыворотки поливалентной антитоксической против сальмонеллеза телят, поросят, ягнят, овец и птиц / М.М. Ходр, А.П. Медведев [и др.]. – Ученые записки учреждения образования «Витебская государственная академия ветеринарной медицины»: научно-практический журнал. – 2012. – Т. 48, – Вып.2, ч.1. – С.144–146.

5 Лагун, Н.В. Иммунологическая эффективность поливалентной вакцины против сальмонеллеза крупного рогатого скота / Н.В. Лагун // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы: сборник научных трудов / Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, Учреждение образования «Гродненский государственный аграрный университет».– Гродно: ГГАУ, 2012. – Т. 19: Ветеринария.– С.64–70.

6 Нежута, А.А. Теоретические и практические основы технологии сублимиционного высушивания биопрепаратов/ А.А. Нежута [и др.].–Курск: Изд-во КГСХА.– 2002.– 239 с.

УДК 619:615:37.012

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОИЗВОДСТВА ВАКЦИНЫ ПРОТИВ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА СВИНЕЙ

Е.Э. ШКОЛЬНИКОВ, Л.В. АНИСИМОВА, Л.Б. СОЛОВЬЕВ,
Л.А. КОРОТЕЕВА, С.В. ТИМОФЕЕВ

*ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический
институт биологической промышленности», г. Щелково, РФ*

Поступила в редакцию 10.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Успех специфической профилактики инфекционных болезней животных во многом зависит от качества выпускаемых биопрепаратов, которое определяется свойствами производственных штаммов микроорганизмов, технологией и условиями производства (4).

Для нужд ветеринарной практики в настоящее время выпускается свыше 50 наименований бактериальных вакцин. Номенклатура этих препаратов периодически изменяется в связи с эпизоотологической ситуацией и разработкой новых вакцин, обладающих более высокой активностью.

Свиноводство в нашей стране является одним из основных источников производства мяса и жира животного происхождения. На фоне специфических условий и, в частности, в связи с концентрацией большого количества свиней на ограниченных территориях возросла роль болезней, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами, в том числе бактериями из рода *Salmonella* (9, 11).

Проблема борьбы с сальмонеллезом свиней в настоящее время стоит особенно остро, так как каждая вспышка инфекции наносит значительный экономический ущерб.

Наиболее эффективной и экономически целесообразной мерой в борьбе с этими болезнями является специфическая профилактика. Однако современные средства специфической профилактики, применяемые на ослабленном иммунодефицитном поголовье свиней, не всегда оказываются достаточно эффективными (2, 4).

Существующие инаktivированные корпускулярные вакцины обладают высокой реактогенностью, токсичностью и недостаточной иммуногенностью. Живые вакцины, имеющие более высокую иммуногенность, могут вызывать вспышки болезни у привитых животных из-за реверсии вакцинных штаммов в вирулентное состояние при многократных пассажах на ослабленном поголовье с иммунодефицитным состоянием (1, 3, 7, 8).

В научной литературе имеются сведения о проведении работ по созданию вакцин из антигенных комплексов, в частности, по разработке препарата на основе лизат-антигенов для профилактики сальмонеллеза поросят послеродового периода (9, 10).

Исследованиями установлено, что применение подобного препарата позволяет получать напряженный специфический иммунитет в более раннем

возрасте. Заболеваемость и общий отход поросят подсосного периода снижались на 7–11% и сохранность поросят в период доращивания повышалась на 25% (10).

В свете изложенного становится очевидной необходимость разработки новых средств специфической профилактики сальмонеллеза свиней.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в отделе бактериальных препаратов ФГБНУ ВНИТИБП.

В работе использовали аттенуированные штаммы *Salmonella typhimurium* № 371 и *Salmonella cholerae suis* № 370.

Выращивание сальмонелл проводили с использованием ранее разработанной нами питательной среды на основе перевара Хоттингера в лабораторных ферментерах АНКУМ-2М, оснащенных системами автоматического контроля и регулирования основных параметров культивирования (температура, pH, eH и pO₂) по разработанному нами режиму.

В процессе выращивания культуры сальмонелл исследовали по следующим показателям: морфология, культуральные свойства, оптическая плотность.

Для получения лизат-антигенов сальмонелл использовали гидроксиды соляно-кислый в качестве дезинтегрирующего агента.

Осаждение антигенов проводили с помощью двузамещенного фосфорнокислого кальция. Для этого использовали реакцию между двузамещенным фосфорнокислым натрием и хлористым кальцием.

Лабораторные испытания экспериментальных образцов вакцин проводили в опытах на кроликах и беспородных белых мышах, производственные испытания – на супоросных свиноматках и поросятах послеотъемного периода.

Для проведения исследований препарат готовили путем смешивания равных объемных количеств антигенов из культур двух штаммов сальмонелл.

В опытах на кроликах определяли оптимальную дозу препарата и его безвредность. Препарат вводили однократно внутримышечно в дозах 300 млн.м.т. (1-я группа); 3 млрд.м.т. (2-я группа); 6 млрд.м.т. (3-я группа); 12 млрд.м.т. (4-я группа); 24 млрд.м.т. (5-я группа); 48 млрд.м.т. (6-я группа).

После введения препарата у кроликов не наблюдалось каких-либо изменений клинического статуса. Даже наибольшая доза (48 млрд.м.т.) свидетельствовала о безвредности испытуемого препарата.

От кроликов брали кровь через каждые 7 суток до 49-го дня включительно и в сыворотке крови определяли количество агглютининов в РА к каждому антигену, входящему в состав препарата.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Через 7 суток после введения антигена наблюдалось повышение титров агглютининов у животных всех шести групп к обоим антигенам.

Наращение уровня агглютининов продолжалось до 28-го дня. Однако это повышение было более существенным у кроликов 2-й–6-й группы по сравнению с 1-й группой. После этого наметилась тенденция к снижению, и к

49 дню уровень агглютининов у 1-й группы кроликов был значительно ниже, чем у всех остальных.

Таким образом, установлено, что оптимальной стимулирующей дозой препарата для кроликов является доза 3 млрд.м.т.

Изучение иммуногенной активности препарата проводилось в опыте на белых мышах, которым однократно подкожно в область спины вводили препарат в дозе 300 млн.м.т на мышь.

Установлено, что ЛД₅₀ культуры *S. cholerae suis* для иммунизированных мышей составила 80 микробных клеток, а для контрольных – 8 микробных клеток; ЛД₅₀ культуры *S. typhimurium* для опытной группы мышей составила 5000 микробных клеток, тогда как для мышей контрольной группы этот показатель был равен 80 микробным клеткам.

Следовательно, однократная иммунизация мышей препаратом в дозе 300 млн.м.т. обеспечивает повышение устойчивости к заражению *S. cholerae suis* в 10 раз, а к *S. typhimurium* в 63 раза по сравнению с неиммунизированными животными.

Испытание опытных серий препарата (безвредность, реактогенность и иммуногенность) провели на продуктивных животных (свиноматки и поросята).

Для изучения безвредности препарата 5-ти свиноматкам за 8 дней до опороса и 10-ти поросятам 35-дневного возраста его ввели однократно, внутримышечно в область шеи в дозе 45 млрд м.т. и 9 млрд.м.т. соответственно, что составило по 3 прививочные дозы. За время наблюдения (10 суток) не были отмечены отклонения в состоянии здоровья – все животные были активны и хорошо поедали корм.

Следовательно, трехкратные дозы препарата 45 млрд. м.т. для свиноматок и 9 млрд. м.т. для поросят являлись безвредными.

Реактогенность препарата изучали аналогично безвредности, только свиноматкам и поросятам вводили по 1 иммунизирующей дозе. Препарат показал свою ареактогенность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При изучении иммуногенной активности препарата установлено, что однократная вакцинация препаратом супоросных свиноматок за 18–20 дней до ожидаемого опороса обеспечивает образование и накопление агглютининов в сыворотке крови и молозиве в высоких титрах, обуславливая колостральный иммунитет против сальмонеллеза у полученных от этих свиноматок поросят.

Колостральный иммунитет против сальмонеллеза у поросят сохраняется до 30–35-дневного возраста. Поэтому активную иммунизацию поросят целесообразно проводить в возрасте 30–35-ти дней. Такая схема иммунизации обеспечивает защиту поросят до 110–120-дневного возраста.

Экспериментальная серия препарата при его применении в качестве средств профилактики в низких дозах в условиях неблагополучного хозяйства позволила повысить сохранность в опытных группах поросят на 25% по сравнению с контрольными группами. Эти данные позволяют рассматривать препарат как перспективный для создания высокоиммуногенной, аректогенной вакцины для профилактики сальмонеллеза свиней.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Ахмадеев, Р.М. Разработка вакцины для специфической профилактики сальмонеллеза у свиней.– Изучение иммуногенности инактивированных вакцин с различными адъювантами/ Р.М. Ахмадеев, А.М. Алимов, Х.Р. Ахмадеева //Ветеринарная патология. –2003, 91.– С.142–144.
- 2 Бурлуцкий, И.Д. Колибактериоз и сальмонеллез поросят и их специфическая профилактика / И.Д. Бурлуцкий // Автореф. дисс...док. вет. наук. Л.–1989.– 39с.
- 3 Костромитинов, Н.А. Поливалентная инактивированная, гидроокисьалюминиевая вакцина против сальмонеллеза сельскохозяйственных животных/ Н.А. Костромитинов, И.А. Домский [и др.] //Бюл. ВИЭВ.– 1989, 71. –С.67–71.
- 4 Максимович, В.В. Сальмонеллез свиней // Автореф. дисс. докт. вет.наук. Белорусский НИИ экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского, Минск, 1995 – 36с.
- 5 Меньшенин, В.В. Культивирование вакцинных штаммов сальмонелл с использованием питательных сред из нетрадиционных источников сырья / В.В. Меньшенин, Е.Э. Школьников, А.А. Раевский, Л.В. Анисимова, Л.А. Коротеева // Достижение науки и техники АПК. –2010, 8.– С.65.
- 6 Меньшенин, В.В. Оптимизация условий культивирования сальмонелл с использованием питательных сред на основе перевара Хоттингера / В.В. Меньшенин, Е.Э. Школьников, А.А. Раевский // Ветеринария и кормление. –2010, 5.– С.8–9.
- 7 Русалеев, В.С. Разработка инактивированных вакцин против сальмонеллеза и пастереллеза свиней / В.С. Русалеев // Современные аспекты патологии животных. Владимир,1999.– С.141–147.
- 8 Самуйленко, А.Я. Перспективные направления в технологии культивирования бактерий при производстве вакцин для ветеринарной медицины / А.Я. Самуйленко, А.А. Раевский, Е.Э. Школьников, Л.В. Анисимова, В.И. Еремец, И.Ю. Фролов // Мат. Межд. науч.-практ. конф. «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов». Щелково, 2005. – С.298–301.
- 9 Сидоров, М.А. Основы профилактики болезней новорожденных телят и поросят/ М.А. Сидоров // Ветеринария. 1987.– 2.– С.10–12.
- 10 Субботин, В.В. Иммуногенные свойства лизат-антигенов из сальмонелл, эшерихий и стафилококка /В.В. Субботин, М.А. Сидоров // Ветеринария, 1996.– 4.– С.24–27.
- 11 Хорш, Ф. Иммунопрофилактика в свиноводстве / Ф. Хорш // Иммунопрофилактика болезней животных. М.: Колос, 1981.– С.306–332.

УДК:619:616.9

ПРИМЕНЕНИЕ НОВОГО АДЬЮВАНТА ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА АНТИРАБИЧЕСКИХ ВАКЦИН

А.Я. САМУЙЛЕНКО, С.А. ГРИНЬ, Ю.И. БАРСУКОВ,
С.А. ДЯЧЕНКО, И.Н. МАТВЕЕВА

*ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический
институт биологической промышленности», г. Щелково, РФ*

Поступила в редакцию 10.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Иммуногенность вакцин увеличивается с использованием в технологии их изготовления неспецифических стимуляторов иммунитета – адьювантов.

Известно применение в качестве адьювантов при изготовлении различных антигенов гидроокиси алюминия $Al(OH)_3$, веществ из группы сапонинов, а также масляных адьювантов (типа адьюванта Фрейнда и др.), которые обладают выраженными иммуностимулирующими свойствами, но имеют реактогенность для животных.

В Российской Федерации при изготовлении вакцин чаще всего используют импортный сапонин, изготовленный фирмой «Merck» Германия.

Целью настоящих исследований явился поиск нового адьюванта, обладающего высокими иммуностимулирующими свойствами и способного заменить импортный препарат «Сапонин» при изготовлении антирабической вакцины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Реагенты для культивирования клеток – сыворотку крупного рогатого скота, вирусологические питательные среды, растворы приобретали в ООО «БиолоТ». Инактивированную антирабическую вакцину готовили из вируса бешенства штамма «Щёлково-51», выращенного роллерным способом в культуре клеток ВНК-21с активностью $10^{6,8}$ ТЦД₅₀/см³. Вирус инактивировали β -пропиолактоном в концентрации 1:4000 в течение 2 ч при температуре 37 °С. Полноту инактивации вируса бешенства контролировали в культуре клеток ВНК-21 по отсутствию фокусов флуоресценции через 48 ч после внесения в неё инактивированного вируса. В качестве поддерживающей среды использовали гидролизат лактальбумина на растворе Хэнкса. После изготовления вакцину подвергали контролю на стерильность, безвредность и иммуногенность. Реакцию нейтрализации вируса (флюоресцентный вируснейтрализующий тест-FAVN) и уровень антирабических вируснейтрализующих антител ВНА определяли в реакции нейтрализации вируса в культуре клеток ВНК-21 по методике, рекомендованной OIE (2012). Результаты реакции выражали в Международных единицах на см³ крови (МЕ/см³). Иммуногенные свойства вакцинного вируса бешенства

определяли методом НИИ (Национальный институт здоровья, США) на белых беспородных мышах массой 11–12 г, иммунизированных внутрибрюшинно с последующим интрацеребральным заражением референтным штаммом «CVS-11» (мозговой штамм). Иммуногенная активность вакцины должна быть не ниже 1,0 МЕ/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из одной партии инаktivированного штамма вируса бешенства приготовили два образца препаратов с разными адъювантами: один – с сапонином, а второй – в комбинации с новым адъювантом этонием. Иммуногенная активность приготовленных вакцин, определённая объёмным методом НИИ на белых мышах, составила 1,8 МЕ/см³ для сапонин-вакцины и 2,04 МЕ/см³ – для вакцины с этонием ($P < 0,05$).

Иммуногенность вакцин изучали на белых мышах, двукратно иммунизированных с интервалом 21 сутки в дозе 0,1 см³. Средние геометрические титры антител у мышей, определённые методом FAVN, через 21 день после первой иммунизации были 2,5 МЕ/см³ для сапонин-вакцины и 3,0 МЕ/см³ для этоний-вакцины. На 21 сутки после второй иммунизации данные показатели составили 3,3 МЕ/см³ и 3,6 МЕ/см³ соответственно.

Антигенную активность экспериментальных образцов вакцин с разными адъювантами изучали на беспородных щенках в сравнении с референтной вакциной. Сыворотку крови щенков исследовали на наличие ВНА методом FAVN (таблица).

Таблица – Динамика вируснейтрализующих антител в сыворотке крови щенков после одно- и двукратной иммунизации разными антирабическими вакцинами

№ группы	препарат	Уровень вируснейтрализующих антител, МЕ/см ³ ($M \pm m$)		
		до вакцинации	на 21-е сутки после первой вакцинации	на 21-е сутки после второй вакцинации
1	референтная вакцина	< 0,10	2,91 ± 0,25	5,30 ± 0,49
2	с сапонином	< 0,10	3,34 ± 0,53	5,21 ± 0,51
3	с этонием	< 0,10	3,54 ± 0,46	5,34 ± 0,40
4	контроль	< 0,10	< 0,10	< 0,10

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты исследований демонстрируют хорошие адьювантные свойства этония. Нельзя не отметить одновременно с вышеописанным свойством этония как адьюванта его фармакологическое действие: этоний обладает бактериостатическим (препятствующим размножению бактерий) и бактерицидным (уничтожающим бактерии) свойством. Этоний оказывает детоксицирующее действие на стафилококковый токсин, обладает местно-анестезирующей активностью, стимулирует заживление ран, трещин сосков вымени у коров, трофических гнойных язв. Поэтому применение известного препарата этоний в качестве адьюванта позволяет расширить ассортимент адьювантов для производства эффективных, безопасных и экономически целесообразных антирабических вакцин.

ЛИТЕРАТУРА

1 Лосич, М.А. Разработка и иммунобиологические свойства новой антирабической вакцины «РАБИФЕЛ» /М.А. Лосич, И.В. Непоклонова, А.Н. Мухин, С.А. Раев, С.В. Грибенча, О.А. Верховский, Т.И. Алипер // Российский Ветеринарный Журнал.–2012.–№2.– С.10–14.

2 Лосич, М.А. Оценка напряженности поствакцинального иммунитета к вирусу бешенства у мелких домашних животных/ М.А. Лосич, И.В. Непоклонова, О.А. Верховский // Материалы 19 Московского Международного Ветеринарного Конгресса. – 2011. – С. – 21

3 Иванов, В.С., Иванов, И.В., Самуйленко, А.Я. Вакцина антирабическая для животных / В.С. Иванов, И.В. Иванов, А.Я. Самуйленко [и др.] // (УНИРЭВ).– Патент на изобретение № 2366457.– 2008.

4 Иванов, В.С. Бешенство животных: экспериментально-теоретическое обоснование разработки, производства, применения культуральных инактивированных вакцин и новые подходы к проблеме экстренной защиты ЦНС от возбудителя бешенства/ В.С. Иванов // Диссертация в виде научного доклада на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук. Щёлково.– 2001.–С.3–60.

5 Самуйленко, А.Я. Инфекционная патология животных / А.Я. Самуйленко, С. А. Гринь, В. И. Еремец, В. И. Клюкина [и др.] // Том II. Бешенство. – Москва, ВНИТИБП. – 2012. – 153 с.

6 OIE, RABIES.– 2012, раздел 2.1.13.

УДК 619:615.28:616.995.1-084

ОБОСНОВАНИЕ И СОЗДАНИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ КОМПЛЕКСНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ПАЗАРИТАРНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ

М.В. ЯКУБОВСКИЙ

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелецкого»,
г. Минск, РБ*

Поступила в редакцию 26.06.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Паразитарные болезни животных по-прежнему остаются важной проблемой для успешного развития животноводства. Они вызывают падеж, уменьшение привесов, качества продукции и выход молодняка, при паразитозах снижается иммунитет, в т.ч. поствакцинальный. Возбудители паразитарных болезней имеют достаточно широкое распространение. Так, только гельминтов у животных насчитывают более 900, причем многие из них, т.н. зоонозы, опасны для человека (трихинеллы, эхинококки, описторхи, финны и другие). Паразитические простейшие также широко распространены и многие опасны для человека (криптоспидии, токсоплазмы, амёбы и др.), опасность представляют многие клещи и насекомые.

Нередко паразитарные болезни носят ассоциативный характер, и ассоциации паразитов часто состоят из гельминтов, простейших, а также гельминтов, простейших и насекомых и т.д., для диагностики, лечения и профилактики которых необходимы особые подходы, современные методы и препараты.

В связи с этим важной проблемой является разработка и применение современных, доступных, недорогих, безвредных и удобных для применения препаратов для борьбы с паразитозами животных.

Наиболее приемлемыми оказались комплексные препараты с иммуностимулирующими свойствами широкого спектра действия, не обладающие эмбриотоксическими, тератогенными и аллергизирующими свойствами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Методические подходы к обоснованию и созданию новых отечественных комплексных препаратов были обусловлены поставленной целью – создание препаратов с высокой эффективностью для лечения и профилактики паразитарных болезней животных и имеющих широкий диапазон действия при ассоциативных паразитозах.

Исследования лабораторных образцов препаратов проводились для определения их фармако-токсикологических свойств и выявления влияния на организм животных. При этом испытания осуществлялись с использованием белых мышей и крыс, кроликов и морских свинок, а производственные испытания эффективности препаратов проводили комплексно в хозяйствах республики на сельскохозяйственных и домашних животных.

Исследования крови и сыворотки крови животных проводили с использованием современных методик, препаратов и оборудования.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Разработка современных комплексных препаратов для лечения и профилактики паразитарных болезней животных преследовала ряд целей, среди которых:

- повышение эффективности комплексных препаратов за счет синергизма составляющих компонентов и уменьшения дозы при применении животным против паразитов;

- максимальное предупреждение резистентности паразитов к препаратам, обусловленное различным механизмом действия компонентов комплексного препарата;

- увеличение продуктивности животных при применении эффективных комплексных препаратов, в т.ч. удоев молока, привесов, выхода молодняка, повышение качества продуктов животноводства и др.;

- повышение иммунитета инвазированных животных после применения комплексных препаратов, особенно если в их состав включены компоненты с иммуностимулирующими свойствами;

- повышение поствакцинального иммунитета животных при использовании комплексных препаратов, в т.ч. и с иммуностимуляторами;

- профилактика зоонозов вследствие применения комплексных препаратов и охраны окружающей среды от загрязнения инвазионными элементами паразитов.

Одним из первых комплексных препаратов, разработанных нами, был «Сульфаметил», состоящий из сульфадимезина и иммуностимулятора метилурацила. Он показал хорошую эффективность при применении инвазированным криптоспоридиями телятам внутрь в дозе 0,12 г/кг живой массы два раза в день три дня подряд.

Более сложным, обладающим многосторонним действием и более эффективным при криптоспориidioзе телят, является новый комплексный ветеринарный препарат «Янсевит». В его состав входят: фумаровая и янтарная кислоты и токоферола ацетат, обладающие иммуностимулирующими свойствами. При криптоспориidioзе телят препарат применяют внутрь в дозе 0,1 г/кг живой массы в течение пяти дней подряд.

Известно, какую проблему для народного хозяйства страны представляет гиподерматоз. Для его терапии и профилактики нами впервые в республике создан новый отечественный препарат «Ивермектим», а также впервые разработано внутрикожное введение препарата «Ивермектим 1%».

Тем не менее, с целью профилактики быстрой резистентности подкожного овода к препаратам в 2005 г. был создан отечественный комплексный препарат «Клозамектим», в состав которого входят ивермектин и клозантел в крайне малых количествах, применение которого при гиподерматозе обеспечивает эффективность 95–100 %, а мясо и молоко от обработанных животных используется без ограничений.

Одной из важных проблем в республике является профилактика фасциолеза животных. Для его профилактики в разное время применяли различные препараты, в основном монокомпонентные – гексахлорпаракил, че-

тыреххлористый углерод, политрем, позже – фенбендазол, триклабендазол, клозантел, альбендазол и др.

Однако для профилактики резистентности и повышения эффективности нами был разработан комплексный препарат «Трифастим», в состав которого входят триклабендазол, клозантел и токоферол ацетат, которые имеют совершенно различные свойства и механизм действия. Препарат является эффективным при фасциолезе жвачных при однократном применении.

Для терапии и профилактики трематодозов, цестодозов и нематодозов, а также ассоциативных гельминтозов плотоядных разработан новый комплексный препарат «Прафентим», в состав которого входит празиквантел и фенбендазол. Препарат в виде таблеток применяют при нематодозах и цестодозах однократно, при трематодозах – один раз в день два дня подряд. Препарат плотоядным нередко применяют за неделю до дегельминтизации.

В дальнейшем были разработаны новые комплексные с иммуностимуляторами препараты – *феналзол, гельминтовет, тетрагельминтоцид, фенбет-20, полипарацид*.

Феналзол – для применения жвачным животным при трематодозах, цестодозах и нематодозах в дозе 0,1 г/кг живой массы внутрь с кормом однократно.

Гельминтовет – для применения крупному рогатому скоту, свиньям и собакам при нематодозах в дозе 50 мг/кг живой массы.

Тетрагельминтоцид – для дегельминтизации крупного и мелкого рогатого скота, зубров, благородных оленей и косуль при трематодозах, цестодозах и нематодозах однократно в дозе 50 мг/кг живой массы с кормом.

Фенбет-20 используют для дегельминтизации крупного рогатого скота, овец, лошадей, свиней, собак, пушных зверей, зубров, кабанов, птицы (куры, гуси, утки) и прудовых рыб при трематодозах, цестодозах и нематодозах.

Полипарацид – комплексный иммуностимулирующий препарат, содержащий фенбендазол, левамизол гидрохлорид, ивермектин и токоферола ацетат. Применяют при нематодозах крупного рогатого скота, свиней, лошадей, кабанов, собак и пушных зверей, в т.ч. при гастрофилезе лошадей с кормами один раз в день два дня подряд.

ВЫВОДЫ

Для повышения эффективности, предупреждения резистентности паразитов необходимо создавать и применять комплексные препараты с иммуностимуляторами.

Комплексные противопаразитарные препараты при применении инвазированным животным обеспечивают высокую эффективность, повышают иммунитет, сохранность и продуктивность, предохраняют окружающую среду от загрязнения инвазионными элементами паразитов.

ЛИТЕРАТУРА

1 Архипов, И.А. Антигельминтики: фармакология и применение / И.А. Архипов. – М. Типография Россельхозакадемии. – 2009. – 405 с.

2 Основы профилактики болезней животных, птиц и рыб с применением

современных препаратов / под. ред. доктора ветеринарных наук, профессора М. В. Якубовского. – Минск, 2008. – 252 с.

3 Паразитарные зоонозы / М. В. Якубовский [и др.]; под. ред. М. В. Якубовского. – Минск: Наша Идея, 2012. – 384 с.

4 Якубовский, М.В. Справочник по паразитологии / М.В. Якубовский ; рец.: Н.Ф. Карасев, А.А. Богуш. – Минск: Наша Идея, 2014. – 349 с.

5 Якубовский, М.В. Современные технологии, средства лечения и профилактики болезней животных / М. В. Якубовский // Ветеринарное дело: специализированное практическое издание по ветеринарной медицине. – 2013. – № 1. – С. 8–14.

УДК 619:616.98:578.825.1:636.5

**ЛАБОРАТОРНЫЕ ИСПЫТАНИЯ ОПЫТНОЙ СЕРИИ
ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ НЬЮКАСЛСКОЙ
БОЛЕЗНИ, ИНФЕКЦИОННОГО БРОНХИТА КУР,
ИНФЕКЦИОННОЙ БУРСАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ И
СИНДРОМА СНИЖЕНИЯ ЯЙЦЕНОСКОСТИ**

О.А. БУБАШКО, Н.В. КНЫШ, Н.И. КОСТЮК

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского»,
г. Минск, РБ*

Поступила в редакцию 01.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Птицеводческая отрасль Республики Беларусь, в основном, развивается на промышленной основе, что способствует ее интенсификации и сокращению сроков производства мяса и яиц. С этой целью перед наукой и практикой появляются новые сложные задачи, одной из которых является создание в стране стойкого благополучия хозяйств по инфекционным и неинфекционным болезням птиц.

К наиболее частым причинам высокой заболеваемости и летальности птицы относятся инфекционные болезни. Они наносят серьезный экономический ущерб промышленному птицеводству, который складывается из повышенного падежа птиц, уменьшения среднесуточных привесов, снижения убойной массы одной птицы, снижения категории мяса, увеличения конверсии корма, снижения рентабельности производства. Поэтому на первом месте в защите птиц от инфекций остается строгий ветеринарно-санитарный контроль предприятий и специфическая профилактика инфекций, которая включает в себя ряд вакцинаций моно- и поливалентными биопрепаратами.

В настоящее время наиболее опасными и распространенными инфекциями птиц являются ньюкаслская болезнь (НБ), инфекционный бронхит кур (ИБК), инфекционная бурсальная болезнь (ИББ). При этом наблюдается активная генетическая трансформация микроорганизмов в сторону повышения вирулентности, антигенной variability возбудителей многих известных инфекций, появление новых малоизученных болезней, к которым относятся синдром снижения яйценоскости (ССЯ), реовирусный теносиновит кур и др., а также существует угроза заноса этих болезней из стран ближнего зарубежья.

Все это ведет к расширению спектра прививаемых инфекций и интенсификации графика вакцинаций. При этом для обеспечения однородного и напряженного иммунитета у птиц следует учитывать время вхождения с вакциной и возраст птицы, когда иммунизация наиболее эффективна. Поэтому с целью сокращения интервалов между вакцинациями целесообразно применять стратегию комплексной вакцинопрофилактики с использованием как живых, так и инактивированных препаратов.

Разработка новых поливалентных инактивированных биопрепаратов позволяет создать напряженный иммунитет у цыплят, снижает антигенную нагрузку на организм птиц, уменьшает стрессовое воздействие, снижает трудозатраты, а также дает возможность менять антигенный состав поливалентной вакцины в зависимости от конкретной эпизоотической ситуации на отдельных птицефабриках. Поэтому целесообразность применения инактивированных вакцин с комбинацией нескольких вирусных антигенов является очевидной.

Исходя из вышеизложенного, сотрудниками отдела болезней птиц РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского» была разработана вакцина против НБ, ИБК, ИББ и ССЯ-76.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вакцина содержит инактивированные антигены вирусов ньюкаслской болезни (штамм «КМИЭВ-V104» (Ла-Сота)), инфекционного бронхита кур (штамм «КМИЭВ-V103», (H-120)), инфекционной бурсальной болезни (штамм «КМИЭВ-13»), синдрома снижения яйценоскости (штамм «КМИЭВ-V114»).

Созданный нами образец вакцины был проверен в лабораторных условиях на следующие показатели: внешний вид, стабильность эмульсии, стерильность, безвредность, реактогенность и антигенность.

Для определения вида, цвета вакцины, наличия в ней посторонних примесей и плесени флаконы с вакциной просматривали в проходящем свете.

При исследовании стабильности эмульсии от трех флаконов изготовленной серии вакцины отбирали стерильной пипеткой по $10,0\text{ см}^3$ вакцины и вносили в каждую из трех стеклянных пробирок, которые закрывали резиновыми пробками. Пробирки с вакциной центрифугировали в течение 20 мин при 2000 об/мин. Высоту образовавшегося прозрачного столбика над нерасслоившейся эмульсией измеряли линейкой.

Определение стерильности вакцины изучали на объединенной пробе от каждого из трех не вскрытых флаконов изготовленной серии вакцины. Для получения объединенной пробы стерильно с помощью стеклянной пипетки отбирали по $15,0\text{ см}^3$ вакцины в стерильный флакон вместимостью 100 см^3 .

Проверку стерильности вакцины проводили путем ее посева на среды МПБ и МПА – для определения загрязнения аэробами и факультативными анаэробами, на среду Китта-Тароцци – для определения присутствия анаэробов, на агар Сабуро – для определения грибково-плесневой контаминации. Питательные среды с посевами выдерживали в термостате в течение 10 дней при температуре 37°C , а для среды Сабуро – при температуре $20\text{--}24^{\circ}\text{C}$. Через

10 дней пробирки с посевами проверяли визуально на наличие роста микроорганизмов.

Проверку безвредности и реактогенности вакцины осуществляли объединенной пробой вакцины, для чего в мерную колбу вместимостью 25 см³ стерильной пипеткой отбирали по 5,0 см³ содержимого каждого из трех флаконов изготовленной серии вакцины и тщательно перемешивали. Опыт проводили на 30 цыплятах месячного возраста из благополучных хозяйств, которых разделили на 3 равные группы по принципу аналогов.

Цыплятам первой опытной группы вводили подкожно в область средней трети шеи приготовленный образец вакцины в дозе 1,0 см³, цыплятам второй опытной группы – 0,5 см³ вакцины, цыплят третьей контрольной группы не вакцинировали.

Наблюдение за общим состоянием птиц контрольной и опытной группами проводили в течение последующих 21 суток.

Сыворотку крови получали от всех цыплят опытной и контрольной групп до вакцинации и через 7, 14, 28 суток после вакцинации для выявления специфических антител. Пробы сывороток цыплят контрольной и опытной групп, полученные до и после вакцинации, исследовали в РЗГА, а также в ИФА согласно инструкции к набору.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При визуальном осмотре лабораторный образец вакцины представлял собой гомогенную эмульсию белого цвета без посторонних примесей и плесени.

Стабильность эмульсии, во всех трех стеклянных флаконах после центрифугирования эмульсия не расслоилась.

При исследовании изготовленного образца вакцины в пробирках с МПА, МПБ, средой Китта-Тароцци и средой Сабура рост микроорганизмов отсутствовал в течение всего времени наблюдения, что свидетельствует о стерильности вакцины.

О безвредности и реактогенности судили исходя из клинического состояния птиц, результатам наружного осмотра места инъекции (по возникновению местной и общей температурной реакции) и результатам послеубойной оценки степени поражения тканей. В течение всего срока наблюдения цыплята контрольной и опытной групп оставались клинически здоровыми. Температура тела птиц была в пределах физиологической нормы, общих реакций организма птиц (вялость, угнетение, потеря аппетита и т.д.) не наблюдалось. В течение первых 5-ти суток у трех птиц первой опытной группы в области введения вакцины регистрировали местные реакции в виде покраснения диаметром до 5,0 мм без изменения местной температуры с небольшой инфильтрацией до 10,0 мм. У остальных птиц из первой и второй группы обнаружили на месте прививки инфильтрат диаметром до 10,0 мм с небольшим уплотнением кожи без покраснения и повышения местной температуры.

В дальнейшем эти изменения исчезали самопроизвольно и к концу срока наблюдений (на 21-е сутки) каких-либо местных реакций не выявляли.

Изготовленная нами вакцина на протяжении всего срока наблюдения не вызывала гибели цыплят опытной группы, клинических признаков забо-

лений и изменений на месте введения у цыплят при ее однократном подкожном введении им в объеме 0,5 см³. Цыплята контрольной группы оставались здоровыми, что свидетельствует о безвредности и отсутствии реактогенности изготовленной вакцины против НБ, ИБК, ИББ и ССЯ-76.

Об *антигенности* вакцины судили по возникновению и нарастанию специфических антител в сыворотках крови. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Динамика накопления титров антител для ньюкаслской болезни и синдрома снижения яйценоскости в РЗГА у цыплят после вакцинации инактивированной вакциной против НБ, ССЯ

Группа	Доза введения вакцины, (см ³)	Титры антител к вирусу НБ (lg)			Титры антител к вирусу ССЯ (lg)		
		7сутки	14сутки	28сутки	7сутки	14сутки	28сутки
опыт	0,5	3,2±0,02	5,9±0,13	9,4±0,15	4,8±0,04	9,2±0,02	12,2±0,02
контроль	Н/В	2,5±0,1	1,3±,02	1,3±,02	0,9±,02	0,9±,02	0,9±,02
титры антител к НБ до вакцинации 2,3±0,3 lg				титры антител до вакцинации н/о			
защитный титр для НБ - 5 lg				защитный титр для ССЯ - 5 lg			

Примечание – н/о – не обнаружено

Как следует из данных таблицы 1, полученный образец инактивированной эмульгированной вакцины против НБ, ИБК, ИББ, ССЯ птиц обладал выраженными антигенными свойствами и формировал высокие титры антител к вирусу НБ. Титры антител к вирусу болезни ньюкасла у цыплят опытной группы достоверно увеличились с $3,2 \pm 0,02$ lg до $9,4 \pm 0,15$ lg через 28 суток после вакцинации. Формирование защитного титра наблюдалось к 14 дню исследования и он достигал максимального значения $9,4 \pm 0,15$ lg через 28 суток после прививки.

Титры антител к антигенам вируса ССЯ у цыплят опытной группы достоверно увеличились с $4,8 \pm 0,04$ lg до $9,2 \pm 0,02$ lg через 21 сутки после вакцинации; формирование защитного титра наблюдалось к 14 дню исследования.

Таблица 2 – Динамика накопления титров антител для инфекционного бронхита кур и инфекционной бурсальной болезни в ИФА у цыплят после вакцинации инактивированной вакциной против НБ, ИБК, ИББ, ССЯ

Титры антител к антигенам вируса ИБК у цыплят опытной группы

Группа	Доза введения вакцины (см³)	Титры антител к вирусу ИБК			Титры антител к вирусу ИББ		
		7сутки	14сутки	21сутки	7сутки	14сутки	21сутки
опыт	0,5	1941±302	1842±136	4304±150	1883±471	2896±255	5582±482
контроль		1536±150			1695±13		
титры антител до вакцинации для ИБК 1524±282				титры антител до вакцинации для ИББ 1733±300			

достоверно увеличились с 1524 ± 282 до 4304 ± 150 через 21 сутки после вакцинации; формирование защитного титра наблюдалось к 14 дню исследования. У птиц контрольной группы нарастания титров антител не возникало.

Титры антител к антигенам вируса ИББ у цыплят опытной группы достоверно увеличились с 1733 ± 300 до 5582 ± 482 через 21 сутки после вакцинации; двукратное увеличение титров наблюдалось к 14 дню после вакцинации. Максимальный титр антител к антигенам вируса ИББ у цыплят контрольной группы регистрировали через 21 сутки исследования. Динамики нарастания титров антител в контрольной группе к вирусу ИББ также не наблюдалось.

ВЫВОДЫ

Изготовленная опытная серия вакцины против ньюкаслской болезни (НБ), инфекционного бронхита кур (ИБК), инфекционной бурсальной болезни (ИББ) и синдрома снижения яйценоскости-76 (ССЯ-76) стерильна, безвредна, не реактогенна.

Вакцинация инактивированной вакциной против ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур, инфекционной бурсальной болезни и синдрома снижения яйценоскости птиц стимулирует антителогенез.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Ассоциированная инактивированная вакцина против синдрома снижения яйценоскости-76, инфекционного бронхита кур, ньюкаслской болезни, реовирусного теносиновита и инфекционной бурсальной болезни птиц и её физико-биологические свойства / В.В. Борисов, Д.А. Лозовой, Д.Л. Долгов [и др.] // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2005. – Т. 3. – С. 292–302.
- 2 Бирман, Б.Я. Опыт ассоциированной иммунизации птиц против инфекционного бронхита и ньюкаслской болезни / Б.Я. Бирман, В.П. Голубничий, Е.А. Лейкинд // Вет. наука – произ-ву. – Минск, 1992. – Вып. 30. – С.15–18.
- 3 Борисов, В.В. Иммуногенная активность инактивированной ассоциированной вакцины против ССЯ и ИБК / В.В. Борисов, Т.В. Хлыбова, А.В. Борисов // Пробл. инфекц. патол. с.-х. ж-ных: тез. докл. конф... – Владимир, 1997. – С.150.
- 4 Дубовой, А.С. Ассоциированные инактивированные вакцины для профилактики вирусных болезней птиц / А.С. Дубовой // Материалы науч.-произв. конф. посвящ. 190-летию высшего вет. обр. в России и 100-летию вет. науки: Ч. 1. – СПб, 1998. – С. 74–75.
- 5 Изучение антигенной активности ассоциированной инактивированной вакцины против синдрома снижения яйценоскости-76, инфекционного бронхита и инфекционной бурсальной болезни кур / О.А. Борисова, В.В. Борисов, С.А. Гусев [и др.] // Произ-во и контроль мед. вет. препаратов, опыт применения и реализации их в странах СНГ: Тез. докл. конф. – п. Вольгинский, 1999. – С. 53.
- 6 Ирза, В.Н., Борисов, В.В., Старов, С.К., Дрыгин, В.В., Борисов, А.В. Иммуитет у кур, привитых инактивированной ассоциированной вакциной. Ветеринария. – 2002, – № 4. С.21–23.
- 7 Рождественский, И.К., Хохлачев, О.Ф. Опыт производства и применения комбинированных инактивированных противовирусных вакцин в птицеводстве. Материалы конференции по птицеводству. – Зеленоград, 2003. – С. 209–210.
- 8 Tahseen, A. Abdul-Aziz. Principles and practice of vaccine-induced immunity.

УДК 619:616.98:578.825.1:615.371

ОТРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА «КМИЭВ-21» ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО ЛАРИНГОТРАХЕИТА ПТИЦ

И.В. НАСОНОВ, Н.В. КНЫШ, О.А. БУБАШКО, Н.И. КОСТЮК

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

Поступила в редакцию 01.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Культивирование вирусов человека и животных проводят с целью лабораторной диагностики вирусных инфекций для изучения вопросов патогенеза и иммунитета, получения диагностических и вакцинных препаратов, применяют в научно-исследовательской работе. В течение многих лет заражение животных оставалось единственным методом культивирования вирусов, что служило серьезным препятствием для получения высококачественных вирусных вакцин и диагностикумов в достаточном количестве. Использование развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ) – важный шаг на пути

разработки вакцин. В РКЭ способны размножаться многие вирусы, так как эта система содержит четыре различных субстрата для вируса с различным тропизмом (амнион, аллантоис, хорион-аллантоисная мембрана и желточный мешок) [1].

Вирус инфекционного ларинготрахеита птиц (ИЛТ) культивируется на хорион-аллантоисной оболочке (ХАО) эмбрионов кур, уток, индеек в некоторых первичных и перевиваемых культурах клеток (КК), не репродуцируется в эмбрионах голубей и диких птиц. На ХАО образуются фокусные поражения в виде мелкозернистых и крупнозернистых бляшек. Узелковые поражения обнаруживаются на всей поверхности ХАО, а очаговые – только на месте инокуляции вируса. В зараженных клетках ХАО образуются внутриядерные включения, а иногда гигантские клетки. В культурах линии СПЭВ, FJ, клеток фибробластов куриных эмбрионов, почки цыплят, утят, эмбрионов свиньи, новорожденных крольчат вирус вызывает на 3–4 день цитопатические изменения, характеризующиеся округлением и зернистостью клеток, лизисом с последующим отторжением. В клетках СПЭВ формируются цитоплазматические включения и многоядерные клетки. Внутриклеточные включения обнаруживаются через 12 ч, а через 36 ч после заражения достигают наивысшей концентрации. В инфицированных КК вирус вызывает образование бляшек [2, 3, 4, 5, 6, 7].

У вируса, выращенного на РКЭ, гемагглютинирующая активность отсутствует. Она иногда проявляется в случае культивирования в первичной КК почки цыплят [1, 6, 7].

Таким образом, вирус ИЛТ хорошо адаптируется к различным видам КК и культивируется на эмбрионах кур, уток, индеек. При этом наиболее оптимальным для накопления вируса ИЛТ является использование SPF РКЭ.

Следует отметить, что данные различных авторов часто расходятся в отношении способа заражения РКЭ и накопления вируса ИЛТ в различных частях РКЭ. Поэтому целью наших исследований было определение оптимального возраста SPF РКЭ для культивирования штамма «КМИЭВ-21» вируса ИЛТ, времени сбора вирусосодержащего материала и уровня накопления вируса в различных частях эмбриона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Нами отработывались параметры культивирования штамма «КМИЭВ-21» вируса ИЛТ на SPF РКЭ, включающие определение оптимального возраста SPF РКЭ для культивирования штамма «КМИЭВ-21», времени сбора вирусосодержащего материала и уровня накопления вируса в различных частях эмбриона.

При определении оптимального возраста SPF РКЭ для культивирования штамма «КМИЭВ-21», времени сбора вирусосодержащего материала заражали по 30 штук 9- и 11-суточных SPF РКЭ, часть из которых инкубировали в течение 96 ч, а вторую часть – в течение 120 ч.

Через 96 и 120 ч все SPF РКЭ охлаждали в холодильнике при температуре +4 – +8°C в течение 6 ч и вскрывали, учитывая изменения эмбрионов, характерные для вируса ИЛТ (уплотнение ХАО с образованием на ней мелкозернистых и крупнозернистых бляшек серо-белого цвета; помутнение

и «тягучесть» эмбриональной жидкости). Вирусосодержащий материал (эмбриональную жидкость и ХАО) отбирали только от SPF ПКЭ с характерными признаками ИЛТ и определяли его биологическую активность титрованием на SPF ПКЭ 11-дневной инкубации, используя по 36 эмбрионов для каждого варианта культивирования. Опыт проводили в трех повторениях.

Динамику накопления штамма «КМИЭВ-21» вируса ИЛТ определяли в эмбриональной жидкости (1 опыт) и в ХАО (2 опыт). Для этого эмбриональную жидкость и гомогенат из ХАО, полученные после заражения 11-суточных SPF ПКЭ штаммом «КМИЭВ-21», титровали на 9-суточных SPF ПКЭ с целью определения биологической активности. Опыт проводили в трех повторениях.

Так же нами проводились опыты по определению оптимального соотношения эмбриональной жидкости и ХАО для сохранения наибольшей активности штамма «КМИЭВ-21» в отобранном вирусосодержащем материале. Для этого нами были проведены опыты по изучению биологической активности вирусосодержащего материала штамма «КМИЭВ-21», полученного при смешивании различного количества эмбриональной жидкости и ХАО SPF ПКЭ. Так как из одного SPF-эмбриона можно отобрать 7–8 см³ эмбриональной жидкости, то мы изучали биологическую активность вирусосодержащего материала, полученного путем отбора 2 см³, 3 см³, 4 см³, 5 см³, 6 см³ и ХАО. Опыты проводили в трех повторениях.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При вскрытии 9-суточных SPF ПКЭ после заражения и инкубации в течение 96 ч наблюдалось незначительное уплотнение ХАО, единичные бляшки серо-белого цвета величиной 1,0 мм, отмечалось помутнение и «тягучесть» эмбриональной жидкости.

При вскрытии 9-суточных SPF ПКЭ после заражения и инкубации в течение 120 ч наблюдалось помутнение и уплотнение ХАО с образованием на ней крупнозернистых бляшек серо-белого цвета округлой формы величиной 1,0 мм, помутнение и «тягучесть» эмбриональной жидкости.

При вскрытии 11-суточных SPF ПКЭ после заражения и инкубации в течение 96 ч наблюдалось незначительное помутнение и уплотнение ХАО, помутнение и «тягучесть» эмбриональной жидкости, единичные крупнозернистые бляшки серо-белого цвета величиной 1,0 мм.

При вскрытии 11-суточных SPF ПКЭ после заражения и инкубации в течение 120 ч наблюдалось помутнение и уплотнение ХАО с образованием на ней крупнозернистых бляшек серо-белого цвета округлой формы, величиной 1,0–2,0 мм, помутнение и «тягучесть» эмбриональной жидкости. При этом в месте инокуляции вирусосодержащего материала ХАО была отечна и поражена крупными (до 4,0 мм в диаметре) узелками, которые, сливаясь между собой, усеивали весь отслоившийся от подскорлупной оболочки хорин-аллантоис.

Таким образом, при заражении 9- и 11-суточных SPF ПКЭ и инкубации 96 ч и 120 ч было выявлено, что наиболее выраженные изменения, характерные для ИЛТ птиц, наблюдались при заражении 11-суточных SPF ПКЭ и инкубации в течение 120 ч.

Результаты определения биологической активности (титр вируса) вирусосодержащего материала, полученного от зараженных 9- и 11-суточных SPF ПКЭ с 96 ч и 120 ч инкубацией, приведены в таблице 1.

Данные по изучению концентрации вируса ИЛТ в вирусосодержащем материале, инфицированном штаммом «КМИЭВ-21», приведены в таблице 3.

Таблица 1 – Биологическая активность вируса ИЛТ в зависимости от времени инкубации

Возраст SPF ПКЭ, сутки	Биологическая активность (титр вируса) ЭИД ₅₀ /см ³	
	Время инкубации	
	96 ч	120 ч
9	5,8±0,2	6,0±0,1
11	6,0±0,1	6,3±0,2

Из таблицы 1 видно, что наиболее высокий титр вируса (биологическая активность) наблюдался у SPF ПКЭ, зараженных на 11-сутки при инкубации в течение 120 ч, и составил 6,3±0,2 lg ЭИД₅₀/см³. При этом титр вируса у SPF ПКЭ, зараженных на 9-сутки при инкубации 120 ч, а также при заражении на 11-сутки при инкубации в течение 96 ч составил 6,0±0,1 lg ЭИД₅₀/см³. Наименьший титр вируса наблюдался при заражении SPF ПКЭ на 9-сутки при инкубации 96 ч и составил 5,8±0,2 lg ЭИД₅₀/см³.

Результаты накопления штамма «КМИЭВ-21» вируса ИЛТ в эмбриональной жидкости и ХАО представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Биологическая активность штамма «КМИЭВ-21» в эмбриональной жидкости и ХАО

Название части эмбриона	Биологическая активность (титр вируса), lg ЭИД ₅₀ /см ³		
	1 заражение	2 заражение	3 заражение
Эмбриональная жидкость	2,8	3,2	2,9
ХАО	6,3	6,3	6,0

Анализ полученных экспериментальных данных показал, что колебания показателей биологической активности штамма «КМИЭВ-21» в эмбриональной жидкости были в пределах 2,8–3,2 lg ЭИД₅₀/см³, а на ХАО – 6,0–6,3 lg ЭИД₅₀/см³.

Таблица 3 – Биологическая активность вирусосодержащего материала, полученного из эмбриональной жидкости и ХАО SPF РКЭ

Количество эмбриональной жидкости, соединенное с ХАО	Биологическая активность (титр вируса), lg ЭИД ₅₀ /см ³			
	1 опыт	2 опыт	3 опыт	Средний титр по трем опытам
2 см ³	6,2	6,3	6,3	6,27±0,05
3 см ³	6,2	6,2	6,3	6,23±0,06
4 см ³	5,5	5,8	6,0	5,77±0,04
5 см ³	4,7	5,3	5,0	5,0±0,03
6 см ³	3,8	4,3	4,2	4,1±0,05

Как видно из таблицы 3, наибольший титр вируса ИЛТ в вирусосодержащем материале, полученном из эмбриональной жидкости и ХАО SPF РКЭ, зараженных штаммом «КМИЭВ-21», наблюдался при соединении одной гомогенизированной ХАО и 2–3 см³ эмбриональной жидкости. Этот фактор необходимо учитывать при производстве вакцины против ИЛТ с целью повышения активности вируса в отобранном материале.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1 Наиболее высокий титр вируса (биологическая активность 6,3 lg ЭИД₅₀/см³) наблюдается у зараженных SPF РКЭ на 11 сутки при инкубации в течение 120 ч.

2 Штамм «КМИЭВ-21» вируса ИЛТ накапливается в большей концентрации в ХАО, чем в эмбриональной жидкости.

3 Для получения вирусосодержащего материала при производстве живой лиофилизированной вакцины для профилактики ИЛТ из штамма «КМИЭВ-21» целесообразно использовать 2–3 см³ эмбриональной жидкости на одну ХАО.

ЛИТЕРАТУРА

1 Гадзевич, Д.В. Особенности размножения и накопления вакцинных и эпизоотических штаммов вируса инфекционного ларинготрахеита птиц в первично-трипсинизированных и перевиваемых культурах клеток / Д.В. Гадзевич, Б.Т. Стегний // Птаківництво: матеріали VI Української конф. по птицеводству з міжнарод. участієм, Алушта, АР Крим, 19–23 сентября 2005 г. / редкол. Ю.О. Рябоконт и др. – Харьков, 2005. – Вып. 57. – С. 382 – 386.

2 Зуев, Ю.В. Культивирование изолята вируса ИЛТ на хорион-аллантоисной оболочке куриных эмбрионов / Ю.В. Зуев // Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных, г. Покров, 13–18 апреля 1992 г. – Покров, 1998. – С. 122–123.

3 Зуев, Ю.В. Подбор биологических систем для культивирования вируса инфекционного ларинготрахеита кур / Ю.В. Зуев, Н.К. Боровская, А.Т. Кушнин // Воп-

росы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии: материалы науч. конф. ВНИИВВиМ, г. Покров, 13–18 апреля 1992 г. – Покров, 1992. – Ч.1. – С. 159–160.

4 Кузнецова, Г.Д. Адаптация и культивирование вируса инфекционного ларинготрахеита кур в культуре клеток / Г.Д. Кузнецова, Л.И. Яременко, Ю.И. Могильный // Сб. науч. трудов ВГНКИ. – 1996. – Т. 59. – С.28–31.

5 Hughes, C.S. Comparison of cultural methods for primary isolation of infectious laryngotracheitis virus from field material / C.S. Hughes, R.C. Jones // Avian Pathol. – 1988. – Vol. 17. – №2. – P. 295–303.

6 Mutalib, A. Studies on transmissibility of a tissue-culture-modified laryngotracheitis virus. / A. Mutalib // J. Vet. Diagn. Invest. – 1992. – Vol. 4. – № 4. – P. 412–415.

7 Schnitzlein, W.M. Propagation of infectious laryngotracheitis virus in an avian liver cell line. / W.M. Schnitzlein, J. Radzevicius, D.N. Tripathy // Avian Dis. – 1994. – Vol. 38. – № 2. – P. 211–217.

УДК 619:615.37.012

ВИРУС НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Т.А. СКОТНИКОВА, И.В. КОВАЛЬСКИЙ,
Э.Ф. ТОКАРИК, С.М. СИНКОВЕЦ, Ю.Д. ФРОЛОВ, А.А. НЕЖУТА

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический
институт биологической промышленности», г. Щелково, РФ

Поступила в редакцию 10.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Ньюкаслская болезнь (НБ) – высококонтагиозное заболевание птиц, которое входит в Перечень карантинных и особо опасных болезней, контролируемых МЭБ. Согласно данным МЭБ в 2012–2013 гг. вспышки заболевания были отмечены в 83 странах мира, в том числе пограничных районах с РФ в КНР, Финляндии, Монголии, Турции, Казахстане [1]. На протяжении последних лет наибольшую угрозу птицеводству РФ и стран ближнего зарубежья представляют вирулентные (мезо- и велогенные) вирусы НБ генотипов VI и VII.

В соответствии с Кодексом МЭБ ни одна страна не может гарантировать благополучие по НБ в популяциях диких и синантропных птиц, приспособленных к жизни вблизи человека, его жилья, в тесном контакте с домашними животными. Вирус может передаваться различными путями: передвижение живой птицы (дикие, экзотические, мигрирующие голуби, домашние птицы, дикие животные), передвижение продуктов птицеводства, людей и оборудования, контаминация кормов, воды и воздуха. Птицы – один из древнейших резервуаров вирусов в природе, по мере развития птицеводства их роль, как распространителя возбудителей опасных антропозоонозов, возрастает. Зоонозы могут быть вызваны такими вирусами, как ящур, бешенство, грипп птиц, ньюкаслская болезнь и др. Так, дикие утки могут бессимптомно переносить велогенные штаммы вируса НБ и служить источником заражения домашней птицы. Особое внимание следует уделять голубям, воронам и грачам, прикармливающимся в птицеводствах.

В Российской Федерации эпизоотическая ситуация по НБ остается напряженной, так как существует постоянная угроза заноса вируса на территорию страны дикими птицами. Импорт инкубационного яйца и гибридных суточных цыплят из 14 стран мира в РФ также представляет угрозу для эпизоотического благополучия отечественного птицеводства. Все это вынуждает держать НБ под пристальным контролем и проводить постоянную вакцинацию всего поголовья птицеводческих хозяйств, в том числе находящуюся в личных подсобных и фермерских хозяйствах граждан в районах расположения птицефабрик, с целью создания буферных иммунных зон. Вакцинация остается главной мерой профилактики и борьбы с ньюкаслской болезнью в России.

Специфическая профилактика НБ в отечественном промышленном птицеводстве основана на комплексном применении живых и инактивированных вакцин. Живые вакцины готовят из лентогенных (Ла-Сота, Бор-74 ВГНКИ, F, B1, V4, Clon-30, Ulster-2C) и мезогенных (H, ГАМ-61, Muksteswar, Komarov, Roakin) штаммов вируса [2].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Куриные эмбрионы как живая система используются в вирусологической практике с 30-х годов XX в. Поскольку вирус НБ хорошо культивируется не только на восприимчивой птице, но и на куриных эмбрионах (КЭ), изолированных хорион-аллантоисных оболочках (ХАО), в культуре фибробластов КЭ, ряде первичных и перевиваемых клетках он становится одной из наиболее предпочтительных моделей для исследования вирусологами и биотехнологами.

Выбор нами вирус-вакцины против НБ из штамма Ла-Сота в качестве основной рабочей модели для исследований обусловлен несколькими причинами, к которым относятся:

- актуальность проблемы профилактики ньюкаслской болезни;
- вирус НБ относится к группе возбудителей, вызывающих антропоозоозы;
- большой объем производства (более половины объема жидких вирусных вакцин, поступающих на высушивание, приходится на долю вакцин против НБ из лентогенных штаммов, преимущественно Ла-Сота) ;
- по технологическим характеристикам эмбриональная вирус-вакцина против НБ является представителем биопрепаратов, производство которых в оптимальных режимах обеспечивается техническими возможностями современного промышленного оборудования (низкотемпературные и сублимационные установки);
- вирус НБ птиц является типичным представителем семейства парамиксо-вирусов, природа и молекулярная биология которых относительно хорошо изучены, что дает возможность приблизиться к пониманию механизмов повреждения и защиты этого биообъекта в процессе производства, длительного хранения и применения вакцин.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На модели вируса ньюкаслской болезни были проведены исследования производственных штаммов вируса по показателям, рекомендованным ВОЗ. Установлено, что по основным характеристикам (среднее время гибели КЭ;

индексы патогенности вируса для цыплят однодневного и 6-недельного возраста при интрацеребральном и интравенозном введениях; стабильность инфекционной активности вируса при pH 2,8–3,0; термостабильность ГА вируса при температуре 56⁰С; агглютинабельность вируса по отношению к эритроцитам петуха, крупного рогатого скота и лошади) вирус НБ лентогенных и мезогенных штаммов, применяемых для производства отечественных вакцин, соответствует требованиям ВОЗ. При электронномикроскопическом исследовании подтверждена морфология и полноценность вирусных частиц исследуемых штаммов. Контаминация чужеродными вирусами не установлена [3].

Разработан метод оценки стабильности биообъектов с применением математического моделирования процесса термоинактивации. Модель основана на двух теоретических положениях.

Первое состоит в том, что процесс тепловой инактивации биообъекта может быть описан кинетически уравнением первого порядка.

Второе положение – для описания зависимости константы скорости инактивации от температуры используется уравнение Аррениуса.

В результате проведенных исследований найдено два количественных показателя стабильности биологической активности вакцин против НБ:

- величина константы скорости инактивации при данной температуре - K_T
- величина снижения титра инфекционности вируса через определенный срок хранения при данной температуре - Δ_T .

Статистически достоверно показано, что величина снижения инфекционной активности лентогенного вируса НБ за семь суток хранения вакцины при температуре 37⁰ С (Δ_{37}) равна величинам снижения инфекционной активности вируса при хранении вакцины в течение шести месяцев при комнатной температуре (Δ_{15-25}) или в течение года при температуре 4–6⁰С (Δ_5). Полученные данные положены в основу прогнозирования сроков хранения вакцины при заданной температуре [4].

Разработан новый стабилизатор для вирусных вакцин. Методологический подход к созданию рецептуры стабилизатора включает сбор и анализ патентной информации (145 рецептов для 25 различных вирусов). Составлена матрица исходных данных 145×7 (вирус, вид нуклеиновой кислоты, размер вириона, компоненты защитной среды: высокомолекулярный, низкомолекулярный, буферная система), которая обработана методом факторного анализа с последующей оценкой факторов регрессионным методом и применением к полученным данным процедуры кластерного анализа. Результаты обработки патентной информации позволили прогнозировать рецептуру эффективной защитной среды. Экспериментально разработку состава стабилизатора для вакцины против ньюкаслской болезни (НБ) проводили с использованием математических методов планирования многофакторных экспериментов и теста «ускоренного старения» (Δ_{37}) для количественной оценки их результатов. Результатом исследований явилась рецептура сложной защитной среды на основе гидролизата белка, эффективной для вирусных вакцин. В состав среды входит гидролизат белка определенного состава, лактоза и калийфосфатная буферная система.

Определены физические характеристики жидких биоматериалов как объектов сушки: температура полного замерзания и интервал эвтектических температур (нижняя и верхняя эвтектические температуры). Знание этих ха-

рактических характеристик позволяет оценить теоретически оптимальные температурные режимы процессов замораживания и сублимации и рассчитать их длительность при применении различных видов посуды, объема высушиваемого материала, а также выбрать соответствующее холодильное и сублимационное оборудование для проведения требуемых режимов сушки.

Для обоснования параметров режимов замораживания и высушивания вакцин проводили многофакторные эксперименты и исследовали кинетику сушки. Полезная информация по кинетике сушки вакцины против НБ с разными стабилизаторами получена с помощью датчика тепловых потоков, разработанного совместно с сотрудниками Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР. На конструкцию датчика и способ контроля процесса сублимационной сушки с его помощью получены авторские свидетельства.

Экспериментально показано, что для каждого конкретного сухого биопрепарата существует критическая величина остаточной влажности, превышение которой ведет к быстрой инаktivации биообъекта. Например, для сухой вирус-вакцины против НБ с защитной средой «обезжиренное молоко» критическим был уровень остаточной влажности в пределах 4–6%, для вакцины с защитной средой на основе пептона – 8–10%.

Обобщение опыта отечественной промышленной технологии сублимационной сушки биоматериалов, методические решения и экспериментальное обоснование совершенствования промышленных режимов сушки представлены в работе [5, 6].

Новые данные по оценке эффективности защитных сред и пониманию природы эффекта повышения стабильности вакцины были получены нами в исследованиях с применением спиновой метки. Разработка методики исследований со спиновой меткой и работа на ЭПР-спектрометре проведены в лаборатории кинетики ферментативного катализа Института химической физики АН СССР под руководством профессора Г.И. Лихтенштейна. Результаты исследования подвижности спиновой метки в образцах вирус-вакцины против НБ с разными защитными средами показали более высокую стабильность вакцины со средой на основе пептона. Эта вакцина обладала более выраженной способностью связывать воду и тормозить протекание каких-либо обменных процессов при увлажнении и нагревании, т.е. была более устойчива к воздействию внешних неблагоприятных факторов. Такой вывод был подтвержден также результатами исследований методом ядерного магнитного резонанса, проведенными совместно с сотрудниками отдела криобиофизики Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР (г. Харьков). Разработанные методики защищены авторскими свидетельствами. Спектроскопические методы сегодня более совершенны и по-прежнему актуальны и перспективны для исследований динамического состояния сложных белковых систем, к которым относятся биопрепараты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1 Экспериментально доказана перспективность использования вируса ньюкаслской болезни в качестве модели для биотехнологических исследований.

2 Проведены исследования производственных штаммов вируса НБ по

показателям, рекомендованным ВОЗ.

3 Разработан метод оценки стабильности биообъектов с применением математического моделирования процесса термоинактивации, новый стабилизатор для вирусных вакцин.

4 Определены физические характеристики жидких биоматериалов как объектов сушки. Для обоснования параметров режимов замораживания и высушивания вакцин проводили многофакторные эксперименты и исследовали кинетику сушки.

5 Результаты исследований используются при усовершенствовании действующих и разработке новых технологий производства биопрепаратов и защитных сред для вирусных вакцин.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Электронный ресурс. – Режим доступа <http://www.oie.int/wahis>.
- 2 Скотникова, Т.А. Вакцинопрофилактика ньюкаслской болезни/ Т.А. Скотникова, Э.Ф. Токарик //Ветеринария и кормление. – 2014. – №6. – С.16–18.
- 3 Скотникова, Т.А. Совершенствование технологии производства и способов применения вакцин против ньюкаслской болезни: Автореф. дис. докт. биол. наук. Щелково. 2010 – 48 с.
- 4 Токарик, Э.Ф. Разработка и оптимизация параметров технологического процесса сублимационной сушки биоматериалов: современный взгляд на достижения и перспективы научного направления / Э.Ф. Токарик, А.А. Нежута, Т.А. Скотникова, Л.А. Неминая, В.В. Панферов: мат. междунар. научно-практ. конф. «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов».– Щелково. – 2009. – С.49–56.
- 5 Сербис, Е.С. Взаимосвязь некоторых показателей качества биопрепаратов, высушенных методом сублимационной сушки / Е.С. Сербис, А.А. Нежута, А.Я. Самуйленко, В.И. Еремец, Т.А. Скотникова//Вестник Академии сельскохозяйственных наук. – 2002. – №4. – С.65–66.
- 6 Теоретические и практические основы технологии сублимационного высушивания биопрепаратов / А.А. Нежута, Э.Ф. Токарик, А.Я. Самуйленко, В.М. Безгин, Е.С. Сербис. – Курск: Изд-во КГСХА, 2002. – 239 с.

УДК: 619:578.23:578.821.41:57.082.26

ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСА МИКСОМЫ КРОЛИКОВ

А.А. ЗГИРОВСКАЯ, Е.С. КОНОНЧИК, Ю.В. ЛОМАКО

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

Поступила в редакцию 31.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время наиболее опасным заболеванием для кроликов является миксоматоз – это вирусная, высококонтагиозная и широко распространенная болезнь, типичными признаками проявления которой являются блефароконъюнктивит, отёчно-студенистая инфильтрация подкожной клетчатки в области головы, гениталий, ануса, других участков тела. Заболевание приводит к высокой летальности животных [1, 2].

Возбудитель представляет собой ДНК-содержащий вирус, относящийся к роду *Leporipoxvirus* семейства *Poxviridae*. Источником возбудителя миксоматоза являются больные и переболевшие кролики, выделяющие вирус с истечениями из носа и глаз. Миксоматоз – одно из самых опасных для кроликов заболеваний, носит эпизоотический характер. Эпизоотии миксоматоза случаются летом и теплой осенью, так как комары и кровососущие насекомые – главные переносчики этого заболевания. Они переносят вирус в своих слюнных железах, при этом сами не болеют. Вирус миксомы устойчив, а в насекомых он способен сохраняться на протяжении длительного времени (до семи месяцев). Огромное значение в распространении возбудителя миксоматоза в природе имеют эктопаразиты – вши, блохи, клещи. Многие насекомые не являются непосредственно носителями вируса, но распространяют его механически [4, 7].

Культивирование возбудителя миксоматоза кроликов проводят на хорион-аллантоисной оболочке куриных и утиных эмбрионов (на них вирус вызывает характерное образование фокусов-оспин) и в культуре почечных клеток диких, домашних кроликов, также крыс, хомяков, морских свинок и человека (в этом случае на монослое культуры клеток вызывает ЦПД, образование бляшек и крупных цитоплазматических включений [3].

Лечение больных миксоматозом кроликов не проводится по причине отсутствия специфических средств терапии и чрезвычайно быстрого распространения болезни внутри поголовья. Переболевшие кролики приобретают напряженный иммунитет против данного заболевания, но длительно остаются вирусоносителями миксомы и тем самым представляют угрозу для здоровых животных. Таким образом, целесообразным будет преимущественное направление усилий в борьбе с миксоматозом на профилактику болезни, т.е. вакцинацию, которая играет первостепенную роль среди мер профилактики и борьбы против миксоматоза кроликов [5, 6].

Учитывая отсутствие отечественных вакцин для профилактики миксоматоза кроликов, целью наших исследований являлась разработка такой вакцины. Первый этап работы заключался в подборе штамма вируса миксомы кроликов, адаптация его к перевиваемым культурам клеток почки зеленой мартышки *Vero* и CV-1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения первично-трипсинизированных фибробластов эмбрионов кур (ФЭК) использовали 11–12-суточные эмбрионы. Трипсинизацию эмбрионов проводили по стандартной методике [3]. Взвесь клеток фильтровали через 3-хслойный марлевый фильтр. По окончании фильтрации марлю отжимали пинцетом, к суспензии добавляли ростовую среду. После чего подсчитывали количество клеток в суспензии в камере Горяева по стандартной методике. Выход клеток от 1 куриного эмбриона составлял 70–100 млн. клеток. Далее производили рассев клеток в матрасы вместимостью 50 и 250 см³ из расчета, чтобы в 1 мл ростовой среды содержалось 800 тысяч клеток. В качестве ростовой среды использовали среду Игла, 0,5% гидролизат лактальбумина и 199 взятых в равных соотношениях с обогащением сывороткой эмбрионов коров. Инкубирование клеток проводили в термостате при температуре 37°C. Монослой, пригодный для заражения, формировался через 36–48 часов.

Жизнеспособные клетки формировали ровный сплошной монослой; характерно наличие определенного количества округленных клеточных элементов, легко отходящих в среду роста при встряхивании. Клеточный монослой был представлен клетками, сохраняющими типичные морфологические черты, без дегенеративных изменений.

Культуру клеток почки зеленой мартышки CV-1 и *Vero* культивировали в пластиковых культуральных матрасах вместимостью 50 и 250 см³ с использованием ростовой среды ДМЕМ-Н (Нерес -12,5) с добавлением бензилпенициллина – 100 ЕД/см³, стрептомицина сульфата – 100 мкг/см³, 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Выращивание культуры проводили в термостате при температуре 37°C.

После формирования 100% монослоя клеток ФЭК, *Vero* и CV-1 из матрасов удаляли культуральную жидкость, монослой отмывали дважды от продуктов жизнедеятельности клеток раствором Хенкса, вносили вирусный материал из расчета 0,5 ТЦД на клетку. В качестве вирусного материала использовали адаптированный штамм вируса миксомы кроликов. Время адсорбции вируса на клетках составляло 90 минут при температуре 33°C, после чего вносили поддерживающую среду, состоящую из Игла, 0,5% гидролизат лактальбумина и 199 для ФЭК и ДМЕМ-Н для CV-1, обогащенную 2% сыворотки эмбрионов коров. Культивировали при температуре 33°C до появления выраженного цитопатогенного действия вируса 72–96 часов. По окончании культивирования вируссодержащий материал замораживали при температуре минус 40–70°C. Затем материал размораживали, сливали во флаконы, отбирали пробы для исследования его инфекционной активности.

Титрование вируса на культуре клеток CV-1 и *Vero* проводили

микрометодом на 96-луночном планшете. Предварительно готовили разведения вируса, начиная с 10^{-1} до 10^{-6} . На планшет вносили по 100 мкл клеточной суспензии в концентрации 180 тысяч клеток в мл, по 50 мкл разведений вируса и инкубировали при температуре 33°C с 5% CO_2 в течение 120–144 часов. Учитывали результат при хорошо выраженном ЦПД. Титр вируса высчитывали по методу Рида и Менча.

Сущность метода определения инфекционной активности вируса на кроликах заключалась в определении наибольшего разведения вируса, которое вызывает изменения кожи животного. Для заражения использовали двух кроликов живой массой 2–2,5 кг. Вирус, начиная с разведения 10^{-6} до 10^{-2} , вводили внутрикожно в депилированные участки кожи в направлении от хвоста к голове в четыре точки по 0,25 мл по линиям, перпендикулярным к позвоночнику, по 2 инъекции с каждой стороны. Следующее разведение вводили на расстоянии 3–4 см³ от предыдущего и т.д.

Таким образом, в кожу боков и спины каждого кролика делали по 20 инъекций. Активность определяли по наличию и размеру фибром, образующихся у кроликов на 6–10-е сутки после введения вируса. При визуальном определении учитывали фибромы размером с гречневое зерно и крупнее. При измерении кутиметром кожа на месте фибромы должна быть толще нормальной не менее, чем на 3 мм. Титр вируса высчитывали по методу Рида и Менча.

Для определения иммуногенной активности адаптированного штамма с использованием вакцинного вируса миксомы были сформированы 2 группы кроликов живой массой 2–2,5 кг – опытная и контрольная. Опытная группа состояла из 4-х кроликов, в контрольную группу входило 2 особи. Кроликам опытной группы вводили по 1,0 см³ вируса внутримышечно в область бедра в дозе 4 lg ИД_{50/см³}. Через 9 суток на 6 кроликах (опытная и контрольная группа) проводили титрование культурального вируса миксомы кроликов. Для этого внутрикожно вводили вирус в разведениях, начиная с 10^{-6} до 10^{-1} , по 0,25 см³ в четыре точки бесшерстного участка кожи. Через 7 суток учитывали результаты заражения кроликов, обращая внимание на местную реакцию – образование фибром в местах введения вируса. В каждой группе (вакцинированной и контрольной) рассчитывали инфекционный титр вируса по методу Рида и Менча и выражали его в ИД_{50/см³}.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Из литературы известно, что для изготовления живой вакцины против миксоматоза кроликов можно использовать следующие вакцинные штаммы вируса миксомы:

- 1 штамм вируса миксомы кроликов В-82;
- 2 аттенуированный вакцинный штамм Микс-98;
- 3 вакцинный штамм вируса миксомы - SG 33;
- 4 штамм MAV/RK-13/20 (штамм вакцины Меварекс).

При подборе производственного аттенуированного штамма вируса миксомы кролика мы исходили из наличия вируса и перечня культур клеток, которые можно культивировать на базе нашего института. Свой выбор мы остановили на штамме вируса миксомы кроликов В-82,

предварительно адаптировав его к перевиваемым культурам клеток почке зеленой мартышки CV-1 и *Vero*. Хотя из литературы известно, что чаще всего этот штамм вируса культивируют на первично-трипсинизированных фибробластах эмбрионов кур и первичных клетках почки крольчонка. Использование первично-трипсинизированных культур для производства вакцин требует высоких материальных затрат, технологический процесс является трудоемким, поскольку предполагает использование в качестве исходного сырья ткани куриных эмбрионов или крольчат. Первичные культуры клеток ПК и ФЭК не стандартизированы по своим свойствам и зависят от индивидуальных особенностей используемых животных и эмбрионов, вирус в этих культурах накапливается в невысоких титрах.

Репродукция вакцинных штаммов вируса миксомы часто характеризуется невысокими уровнями его накопления. Поэтому вопрос о повышении урожая вируса при его культивировании в культуре клеток является актуальным. В связи с этим для достижения накопления выбранного штамма вируса миксомы в достаточных для изготовления вакцины титрах было необходимо подобрать линию клеток и отработать параметры культивирования в ней вируса. Вирус миксомы кроликов культивировали на перевиваемых линиях клеток CV-1 и *Vero*. Культура клеток *Vero* хорошо изучена в нашем институте, поэтому основное внимание мы уделили особенностям культивирования клеткам CV-1. На первом этапе работы определяли, при какой посевной концентрации клеток получается наиболее подходящий монослой для заражения вирусом миксомы. Для определения оптимальной концентрации клеток при пересеве исследовали концентрации 80, 100, 120, 150, 200 тыс.кл/см³ среды. Клеточный монослой формировался в течение 24 часов при пересеве клеток в концентрации 150 – 200 тыс.кл/см³, в течение 40–48 часов при концентрации клеток 80–120 тыс.кл/см³. Вирусом миксомы заражали матрасы с клеточным монослоем, сформированным через 24, 36–40 часов. Культивирование вируса проводили в течение 3-х пассажей. Цитопатическое действие вируса на клетки стало четко проявляться только на 3-ем пассаже. Наиболее четкая картина действия вируса на клетку проявлялось на 2-хсуточной культуре клеток при посевной концентрации 80–120 тыс.кл/см³.

При заражении культуры клеток *Vero* цитопатическое действие вируса проявилось к 4-му пассажу. Цитопатическое действие вируса в культуре клеток как CV-1, так и в *Vero* характеризовалось округлением клеток, стягиванием их в тяжи, формированием из этих тяжей «паучков», в дальнейшем образовывались «окна» между «паучками», монослой отслаивался от стекла.

На культуре ФЭК цитопатическое действие выявлялось на первом пассаже.

Вирус, адаптированный к культуре клеток CV-1 и *Vero*, был депонирован в коллекции микроорганизмов института с присвоением ему номера КМИЭВ-V141.

Следующий этап работы заключался в отработке оптимальных условий культивирования вируса в культурах клеток CV-1 и *Vero*, а именно, времени адсорбции вируса на клетку и заражающей дозы вируса.

Согласно данным литературы, адсорбция вируса миксомы на клеточном монослое необходима, время адсорбции вируса в зависимости от штамма вируса и линии клеток значительно варьирует от 30 минут до 3 часов.

Адсорбцию вируса на клетках CV-1 и *Vero* проводили в течение следующих интервалов времени: 30 минут, 1 час, 1,5 часа, 2 часа, 2,5 часа, 3 часа. После чего добавляли поддерживающую среду и инкубировали зараженную культуру при температуре 33°C до полного развития цитопатогенного действия вируса. Вирусосодержащий материал замораживали при температуре минус 40–70°C, затем размораживали, отбирали пробы для определения инфекционной активности, сливали жидкость во флаконы и замораживали при температуре минус 40–70°C. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Зависимость титра вируса от времени его адсорбции на клетках CV-1 и *Vero*

Время адсорбции вируса, минут	Титр вируса, lg ТЦД _{50/см} ³	
	культура клеток CV-1	культура клеток Vero
30	1,25	0,75
60	5,5	5,0
90	5,8	5,3
120	5,2	5,3
180	5,25	4,25
240	3,5	1,75

Как видно из таблицы 1, наиболее оптимальным временем адсорбции вируса в культуре клеток CV-1 является 60 и 90 минут, титр вируса при этом составлял 5,5–5,8 lg ТЦД_{50/см}³, а в культуре клеток *Vero* – 90 и 120 минут, титр достигал величины 5,3 lg ТЦД_{50/см}³.

Следующий этап заключался в определении заражающей дозы вируса, при которой наблюдается максимальное его накопление в клетках почки зеленой мартышки CV-1 и *Vero*.

Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Изучение влияния заражающей дозы вируса на его накопление в клетках CV-1 и *Vero*

Доза вируса, ТЦД _{50/клетка}	Титр вируса, lg ТЦД _{50/см} ³	
	культура клеток CV-1	культура клеток <i>Vero</i>
0,1	1,25	0,75
0,2	1,5	1,0
0,3	4,8	3,3
0,4	5,3	5,5
0,5	6,05	6,0

Как видно из таблицы 2, наиболее оптимальной дозой заражения является 0,4–0,5 ТЦД_{50/клетка}, при таких дозах заражения вирус накапливается в максимальных титрах от 5,3 до 6,05 lg ТЦД_{50/см}³.

Установлено, что при длительном пассировании вируса на перевиваемых клетках (10–12 пассажей) титр начинает падать. Чтобы предотвратить снижение биологической активности вируса мы использовали перемежающие пассажи вируса на первичных фибробластах эмбрионов кур (2 последовательных пассажа). После чего титр вируса на культурах клеток CV-1 и *Vero* значительно возрастал и достигал величины 6,0–6,5 lg ТЦД_{50/см}³.

В дальнейшем определяли, обладает ли адаптированный штамм вируса миксомы кроликов иммуногенной активностью.

Иммуногенную активность вируса определяли с использованием вакцинного вируса миксомы. При определении иммуногенной активности считали, что вирус обладает иммуногенной активностью, если титр его был ниже не менее, чем на 3 lg по сравнению с титром на контрольных животных. Установлено, что адаптированный штамм вируса миксомы кроликов обладает иммуногенной активностью, так как титр вируса у опытных кроликов был ниже на 4,0 lg по сравнению с контрольными животными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1 Для разработки технологии изготовления вакцины против миксоматоза кроликов был подобран штамм вируса миксомы кроликов и адаптирован к перевиваемым линиям клеток CV-1 и Vero.

2 Титр вируса миксомы кролика при культивировании в культурах клеток CV-1 и Vero составлял $6,0-6,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

3 Установлено, что наиболее оптимальной дозой заражения культуры клеток CV-1 и Vero является доза $0,4-0,5 \text{ ТЦД}_{50}/\text{клетка}$, так как при такой дозе заражения наблюдается максимальное накопления вируса при культивировании.

4 Установлено, что адаптированный штамм вируса миксомы обладает иммуногенной активностью и может быть использован для изготовления вакцины для профилактики миксоматоза кроликов.

ЛИТЕРАТУРА

1 Герасимчик, В.А. Инфекционные и незаразные болезни пушных зверей и кроликов: учеб.-метод. пособие / В.А. Герасимчик.; ВГАВМ.-Витебск, 2011. – 190 с.

2 Коломыцев, А.А. Миксоматоз кроликов/ А.А. Коломыцев, О.Н.Будринская// Кролиководство и Звероводство [Электронный ресурс].–2005.–№6.–Режим доступа: – Дата доступа: 19.02.2015.

3 Дьяконов, Л.П. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) /Л.П.Дьяконов // Москва.–2009.– С.126–128.

4 Кудряшова, А.А. Инфекционные болезни животных: учебн. пособие/ А.А. Кудряшова; под ред. А.А. Кудряшовой, А.В. Святковского. СПб.: Изд-во «Лань».– 2007.– С.466–470.

5 Сюрин, В.Н. Частная ветеринарная вирусология: справочная книга / В.Н. Сюрин, Н.В. Фомина. – М.: Колос,–1979. – 472с.

6 Шевченко, А.А. Вирусные болезни кроликов / А.А. Шевченко, Л.В. Шевченко//М.: Изд-во "Аквариум-Принт". –2007. –С.45–54.

7 OIE Myxomatosis // [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/MYXO-EN.pdf. – Дата доступа: 24.06.2015

УДК 619:638.1:57.086.83

КРИОБИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ПЧЕЛОВОДСТВЕ

З.Н. САЙФУТДИНОВА, М.И. ГУЛЮКИН

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии имени Я.П. Коваленко», г. Москва, РФ

Поступила в редакцию 30.06.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Фундаментальные и прикладные исследования в криобиотехнологии животных востребованы для гено-, цито-, и эмбриоинженерии с использованием сохраненных геномов, восстановления биоразнообразия, спасения редких и исчезающих видов на Земле. Разработка криобиотехнологических методов в разведении, воспроизводстве и сохранении геномов сельскохозяйственных животных необходима в связи с нарастающей угрозой экологического и экономического кризиса. В этом направлении исследований имеется потребность в новых модельных организмах, и таким объектом может послужить медоносная пчела (*Apis mellifera*) в свете открытий последнего десятилетия, сделанных на ней.

Геном медоносной пчелы был полностью секвенирован в 2006 г., что обеспечивает новые возможности в исследовании медоносных пчел, позволяет проводить сравнение их с другими разновидностями пчелиных и филогенетически более отдаленными организмами. С открытием у пчел явления метилирования ДНК – основного эпигенетического механизма, который не обнаружен у более близкого вида дрозофилы, но выявлен у млекопитающих и человека (6), пчела медоносная становится важным модельным организмом в генетике и биотехнологии. Наличие такого объекта особенно значимо для исследований в области биологии развития и старения, социального поведения, нейробиологии, иммунитета и адаптации к окружающей среде. Криотехнология репродуктивных клеток в сочетании с другими биотехнологическими методами (такими как искусственное осеменение пчелиных маток, получение и хранение культивируемых клеточных линий и др.) позволит изучать пчелу в дополнение этих фундаментальных исследований, а также в сохранении и воспроизводстве самой пчелы медоносной.

Криоконсервация спермы различных животных довольно широко применяется в практике их разведения, воспроизводства и сохранения. Однако этого нельзя сказать в отношении такого объекта, как медоносная пчела. Медоносная пчела имеет специфические особенности в биологии развития и спаривания, поэтому требуется разработка и внедрение в практику пчеловодства искусственного осеменения пчелиных маток совместно с криоконсервацией спермы трутней. При этом в биологии развития медоносных пчел имеются видовые признаки, как осложняющие проведение селекционно-генетических работ в пчеловодстве, так и создающие благоприятные условия для применения криоконсервации репродуктивных клеток (5).

Впервые в России криоконсервация спермы трутней с последующей проверкой степени выживаемости и оплодотворяемости была проведена по методике, разработанной Какпаковым с соавторами, и на которую получен патент (№2173045 от 10.09.2001) (3). В 2005 году по этой методике в криобанк Института заложены образцы спермы трутней с пасеки Башкирской опытной станции пчеловодства и с «Царской пасеки» Измайловского парка г. Москвы. Однако данная методика не получила широкого применения. В задачу наших исследований входила модернизация метода криоконсервации спермы трутней и поиск путей оптимизации питательных сред для разбавления и хранения спермы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Лабораторные исследования выполнялись на базе отдела клеточной биотехнологии и лаборатории болезней пчел ВИЭВ с использованием модифицированной методики Какпакова и др. (3) по криоконсервации спермы трутней. Жизнеспособность спермы определялась по общепринятой методике с применением 0,5% раствора трипанового синего (2) и прибора NS 100. Для отбора спермы трутней использовались различные капилляры и криопробирки для хранения в жидком азоте. При криоконсервации и поддержания культур клеток применялись ДМСО, эмбриональная телячья сыворотка и питательная среда Какпакова С-46, для оптимизации которой использовались маточное молочко и его синтетические компоненты. Опыты по влиянию маточного молочка проведены на клеточной линии Sf 9 (бабочка-совка) из коллекции ВИЭВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проверена жизнеспособность спермы из закладок 2005 года (хранение около 10-ти лет), которая равнялась 85–90%. Жизнеспособность спермы трутней из закладок 2014 года с пасек Московской и Тверской области (хранение около 10 месяцев) оказалась равна 70–85%. Парадоксальное снижение выживаемости спермы трутней за 10 месяцев хранения по сравнению с более длительным хранением требует тщательного изучения условий криоконсервации.

Поэтому модернизация используемой нами методики Какпакова и др. заключалась в необходимости унификации отдельных этапов: отбор, транспортировка, хранение, оттаивание и введение спермы трутней в матку (искусственное осеменение матки дефростированной спермой). Для этого нами были проверены стеклянные и пластиковые капилляры для набора спермы с разным диаметром. Сперма отбирается в капилляр, соединенный со шприцем в приборе искусственного осеменения пчелиных маток. Проблема заключается в том, что с одной стороны капилляр часто забивается в связи с попаданием в него вместе со спермой мукуса (клейкое вещество), для этого нужен капилляр с большим диаметром. С другой стороны для осеменения маток нужен маленький диаметр капилляра. Именно поэтому необходимо подобрать в дальнейшем оптимальный диаметр капилляра, удобный и для набора спермы и для осеменения маток, либо пойти другим путём. В 2014 г. стандартный капилляр (трубка ПВХ) со спермой запаивали

с двух сторон, маркировали и закладывали в криопробирки, которые транспортировали и хранили в жидком азоте.

Крайне важными моментами является не только оценка влияния длительности хранения в жидком азоте на жизнеспособность и оплодотворяющую способность спермы, но и генетические изменения (мутации) в них. В этом направлении планируется проведение исследований.

Таким образом, опыт применения криоконсервации спермы трутней в целях сохранения генофонда и управления генетическими ресурсами среднерусской пчелы показал, что для создания криобанка необходима тщательная разработка методов и условий сбора, транспортировки, хранения и оттаивания репродуктивных клеток и дальнейшего их использования в искусственном осеменении маток.

В отличие от других сельскохозяйственных животных на медоносной пчеле удобно отбирать репродуктивные клетки – сперму и яйцеклетки. Следующим этапом после криоконсервации репродуктивных клеток является криоконсервация зародышей. Известно, что положительное влияние на развитие зародышей оказывает совместное культивирование их с монослоем эпителия яичника. Поэтому были начаты работы по получению культур клеток из яичников маток медоносных пчел. Для этих целей и для криоконсервации спермы трутней требуется обогащенная питательная среда, оптимизация которой проводилась путем добавления продуктов пчеловодства.

Продукты пчеловодства (мёд, пыльца, перга, прополис, пчелиный яд, маточное молочко) по аналогии с биологически активными веществами (БАВ) называют биологически активными продуктами пчеловодства (БАПП). В отделе клеточной биотехнологии ВИЭВ с 2010 года проводится изучение влияния БАПП на культуру клеток позвоночных и беспозвоночных (1, 4). На данном этапе работы в задачу входил поиск оптимальной концентрации маточного молочка, влияющих на пролиферативную активность культуры клеток насекомых Sf9 с целью их дальнейшего применения в получении/поддержании клеточных линий и для криосохранения/восстановления репродуктивных клеток.

Выявлен эффект действия малых доз маточного молочка, когда меньшие концентрации оказывают более сильное влияние на пролиферацию клеток в культуре и бимодальный характер этого влияния. Концентрация маточного молочка 0,001% и ниже были более эффективны при действии на рост культуры клеток насекомых. Число клеток в опыте было в два раза больше по сравнению с контролем ($10,5 \times 10^6$ клеток/мл) на 10-й день культивирования. Эти результаты, вероятно, свидетельствуют о вовлечении компонентов маточного молочка в эпигенетические механизмы, связанные с ростом и делением клеток (в контроле на 10-й день количество клеток обычно идет на убыль). Начаты исследования по влиянию на культуры клеток синтезированных компонентов маточного молочка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определено качество размороженной спермы трутней после 10-ти лет хранения, степень ее выживаемости была равна 85–90%, и 10-тимесячного хранения, степень выживаемости которой оказалась ниже – 70–85%. Выяв-

лен эффект действия малых доз маточного молочка на культуру клеток, когда меньшие концентрации оказывают более сильное влияние на пролиферацию клеток в культуре и бимодальный характер этого влияния. Всё это даёт нам основание предположить, что ростостимулирующим эффектом и сигнальной активностью нанодоз маточного молочка обладают входящие в него компоненты.

По результатам наших исследований можно сделать следующие предварительные выводы: длительность хранения спермы трутней не влияет на их выживаемость; маточное молочко в нанодозах обладает ростостимулирующим эффектом на культуры клеток насекомых

ЛИТЕРАТУРА

1 Васильев, В.А. Влияние продуктов пчеловодства на рост культуры клеток / В.А. Васильев, В.Т. Какпаков, З.Н. Сайфутдинова // Пчеловодство. – №7. – 2011. – С.48–49.

2 Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) / Под общ. ред. проф. Дьяконова Л.П. – М.: Изд. «Спутник+», 2009. – 656 с.

3 Какпаков, В.Т. Способ получения плодных маток / О.В. Кабаева, А.В. Бородачев, В.Т. Бородачева // Патент на изобретение РФ №2173045 С2, 2001.

4 Сайфутдинова, З.Н. Влияние продуктов пчеловодства (пыльцы, перги и маточного молочка) на рост культуры клеток позвоночных и беспозвоночных жив-х. / З.Н. Сайфутдинова, Т.В. Гальнбек, В.А. Васильев // Веткорм, 2013. – №4. – С.54–5.

5 Сайфутдинова, З.Н. Опыт применения криоконсервации спермы трутней в сохранении генетических ресурсов медоносной пчелы // Материалы международной конференции «Криоконсервация генетических ресурсов. Современное состояние, проблемы и перспективы». – Пуцино, 28–30 октября, 2014. – С. 177–179.

6 Kucharski, R, Maleszka, J., Foret, S., Maleszka, R. Nutritional Control of Reproductive Status in Honeybees via DNA Methylation. Science, 2008, 319: 1827–1830.

УДК 638.145.5

ОСОБЕННОСТИ УСОВЕРШЕНСТВОВАННОЙ ТЕХНОЛОГИИ ВЫРАЩИВАНИЯ ПЧЕЛИНЫХ МАТОК

Н.Г. ЕРЕМИЯ¹, А. Н. ЗАГАРЕАНУ²

¹Государственный Аграрный Университет Молдовы, г. Кишинев, Молдова

²Научно-практический институт Биотехнологий в Зоотехнии
и Ветеринарной Медицине, с. Максимовка, Молдова

Поступила в редакцию 10.06.2015 г.

Успехи пчеловодства во многом зависят от организации и уровня развития племенной базы, усовершенствования методов выращивания пчел. Ценный племенной материал можно быстро размножить с помощью матководной работы.

От того, какими матками будут снабжаться пасеки общественного и частного сектора, а также пчеловодов-любителей, от качества маток и их генетического потенциала в значительной степени зависит продуктивность пчелиных семей, а следовательно, производительность труда пчеловодов.

На качество маток влияют способы и сроки их вывода, наследственные признаки, состояние семей-воспитательниц (сила, запас корма), температурный режим в гнезде, возраст, количество привитых личинок, условия погоды, характер цветения пыльценосов и выделение нектара растениями, также возраст самих маток.

Известно, что семьи пчёл с молодыми однолетними матками собирают мёда больше на 42,4%, с двухлетними – на 20,8%, чем с трёхлетними. Возраст маток влияет не только на продуктивность пчелиных семей, но и на развитие, наращивание пчёл к главному медосбору и в осенний период, что способствует лучшей зимовке пчёл, повышению их резистентности и меньшему поражению различными заболеваниями.

Природные и климатические условия Молдовы позволяют получать плодных маток в середине мая. Для обеспечения и замены старых маток племенными пчеловоды пользуются услугами матководных пасек. Их главными задачами являются ведение селекционно-племенной работы и репродукция чистопородного материала (карпатских пчёл) путём искусственного вывода маток. Для массовой репродукции карпатских пчел на матководных пасеках с учетом результатов бонитировки, хозяйственно полезных и экстерьерных признаков формируются племенные группы.

Особое внимание уделяется экстерьерным признакам. Для этого в весенний период (март–апрель) отбирают образцы пчел, у которых измеряют длину хоботка, длину и ширину 3-го тергита, 3-го стернита, правого переднего крыла, лапки, дискоидальное смещение, кубитальный индекс и др.

Для вывода пчелиных маток на матководных пасеках выделяют следующие группы семей: *материнские, отцовские, семьи-стартеры, се-*

матки-воспитательницы, семьи-инкубаторы, матки-помощницы и пользовательные семьи [1].

Отцовские семьи предназначены для выращивания высококачественных трутней, обладающих повышенной оплодотворяющей способностью при свободном спаривании, а также для получения спермы при инструментальном осеменении маток. В качестве отцовских семей выделяют лучшие по продуктивности, зимостойкости и здоровью семьи, а также обладающие типичными признаками карпатской породы.

Материнские семьи предназначены только для получения молодых личинок или яиц для выращивания маток. В качестве материнских семей выделяют лучшие по продуктивности, зимостойкости и здоровью семьи, отличающиеся хорошим развитием и высокой плодовитостью маток, а также обладающие типичными признаками, которые соответствуют стандартам карпатской породы.

Семьи-воспитательницы предназначены для выращивания маток из принятых молодых личинок. Семьи-воспитательницы выделяют из числа сильных, продуктивных, здоровых семей, отличающихся хорошим развитием и воспитательной способностью. Ко времени постановки личинок на воспитание в каждой семье должно быть не менее 2,0–2,5 кг пчел (10–12 улочек), в том числе достаточное количество физиологически молодых (в возрасте до 12 дней) пчел с развитыми железами, выделяющими личиночный корм.

Кроме того, в гнезде семьи-воспитательницы постоянно должно быть не менее 7–9 кг доброкачественного меда и 2–3 рамки с пергой. При раннем выводе маток для наращивания большого количества молодых пчел необходимо подсилить семьи-воспитательницы печатным расплодом из семей-помощниц, давать им ежедневно по 400–500 г теплого сахарного сиропа (1:1), по 200–300 г медово-пыльцевой подкормки и тщательно утеплять гнездо.

От семьи-воспитательницы отбирают матку и весь открытый расплод, лишая ее возможности вывести новую матку из своих личинок.

Для этого за 9–10 дней до постановки личинок на воспитание матку вместе с тремя-четырьмя сотами изолируют разделительной (Ганемановской) решеткой от остальной части гнезда. За 5–6 часов до постановки личинок матку со всем открытым расплодом отбирают из семьи и помещают во временный отводок в другой улей или же оставляют ее в том же улье, но за глухой перегородкой. В дальнейшем эта семья будет служить для подсиления запечатанным расплодом осиротевшей семьи-воспитательницы.

При недостаточном количестве корма в семьях-воспитательницах, пчел необходимо дополнительно подкармливать. Для стимуляции роста пчелиных семей в весенний период рекомендуется скармливать им 50% сахарный сироп с добавлением кормовой добавки, включающей штаммы лакто- и бифидобактерий. Подкормка проводится из расчета один литр смеси на пчелиную семью, вечером, через каждые 10–12 дней, начиная с первых дней апреля месяца до начала главного медосбора [3].

Предложенный способ обеспечивает наращивание силы пчелиных семей, повышение плодовитости маток, количества печатного расплода и увеличение медовой продуктивности.

На маточное воспитание берут личинки не старше суток после выхода из яйца. Самые ценные матки выводятся из личинок, которые в самом начале личиночной стадии были переведены на маточное воспитание.

При отборе молодых личинок для выращивания маток необходимо учитывать, что матки, выращенные из мелких яиц, отложенных в период высокой яйценоскости, отличаются более низкой живой массой, меньшим количеством яйцевых трубочек и недостаточной плодовитостью.

Поэтому в племенных материнских семьях отсаживают маток в специальное отделение-изолятор на 3 рамки, ограниченные с боков разделительными решетками. В таком отделении 2 крайних сота заняты медом и пергой, а средний (светло-коричневый) – свободный, предназначен для засева яиц маткой.

Изолятор размещают в середине гнезда напротив летка. В нем всегда находится большое количество разновозрастных пчел, которые обеспечивают оптимальные условия жизнедеятельности матки.

Таким образом, матка откладывает ограниченное количество крупных яиц, из которых выводятся матки высокого качества. Средний сот с отложенными в нем яйцами через трое суток помещают в основную часть гнезда этой семьи, а вместо него ставят такой же сот под засев.

На четвертый день после этого можно отбирать личинки для прививки и вывода маток. Личинки отбирают из ячеек, находящихся в верхней и центральной частях сота, так как они лучше снабжались личиночным кормом, интенсивнее развивались и соответственно матки будут лучшего качества.

После отбора личинок сот возвращается в основную часть гнезда. Для обеспечения нормальной работы материнской семьи она снабжается необходимым количеством качественных сотов под засев. Постоянное ограничение яйцекладки матки и отбор личинок приводят к ослаблению материнской семьи, поэтому ее после каждого отбора личинок подсиливают 1–2 рамками зрелого печатного расплода от маток-помощниц.

Личинки прививают в специально приспособленных для этих целей помещениях или лабораториях, где поддерживается температура воздуха 24⁰С и влажность 80%.

Рамку с личинками располагают на столе или закрепляют в рамкодержателе, который позволяет фиксировать рамку в удобном положении. Важно обеспечить хорошее освещение ячеек, проникающее до их основания. Для этих целей применяют лампы дневного света или любой другой осветительный прибор и медицинский рефлектор для получения отраженного света.

В мисочки переносят пчелиные личинки в возрасте 9–12, но не старше 24 часов. На дно мисочки можно предварительно поместить небольшое количество маточного молочка или мёда. Такой перенос называют **«влажной прививкой»**. При этом личинки легче снимаются со шпателя в мисочку. Молочко для этих целей нужно брать из ячеек с личинками не старше возраста прививаемых личинок, а мед – из запечатанных ячеек. Личинок также успешно прививают и **«в сухую»**.

Для переноса личинок из ячеек в мисочки используют шпатель. Он изготавливается из алюминиевой проволоки диаметром 2 мм. Один конец шпателя должен быть загнут и приплюснут в виде тонкой слегка вогнутой,

закругленной лопаточки шириной около 1 мм. Коленообразный стигб находится примерно на 2 см выше ложечки, благодаря чему прививаемую личинку хорошо видно в глубине ячейки (рисунок 1).

Рисунок 1– Технологический процесс по прививке личинок

Для стимуляции семей-увеличения длины, точников, неплодных разработан способ использования кор-гласно рекомендован-кормилиц подкармли-сиропом, в который бавку, включающую фидобактерий в коли-



ции приема личинок воспитательницей, диаметра и веса ма-и плодных маток был выращивания маток с мовых добавок. Со-ному способу, пчел-вают 50% сахарным вводят кормовую до-штаммы лакто- и би-честве $1 \cdot 10^6$ КОЕ в 1

г, а также и, в % мас. Лактулозу – до 5, экстракт дрожжей – до 20, пектин – до 10, в количестве 100–200 мг/л сиропа. Подкормку проводят ежедневно, из расчета 1 л смеси на одну пчелиную семью, с момента постановки прививочной рамки и до запечатывания маточников в течение 5 дней.

Результаты предложенного способа состоят в стимуляции приема личинок на выращивание, увеличение длины, диаметра и веса маточников, неплодных и плодных маток. При реализации указанной технологии обеспечивается прием личинок на выращивание маток на 15,3–25,7% больше, чем при обычной технологии, длина маточника увеличивается на 0,1–0,2 см или на 3,7–7,8% и диаметр – на 0,03 см или на 2,5%, живой вес неплодных маток – на 1,94–6,62 мг или на 1,1–3,8% и плодных – на 20,86–26,19 мг или на 9,1–11,7% [2].

Данная технология была запатентована в Республике Молдова и представлена на Международной выставке «Inventica-2013», Яссы и Клуж-Напока, 2015 (Румыния), где была отмечена дипломами и золотыми медалями (рисунок 2).

Отбор плодных маток из нуклеусов желательно проводить рано утром, до начала активного лета пчел. Плодность маток определяется только по наличию свежего засева на сотах. Матки метятся краской, маркером или специальным номером в верхней части груди (рисунок 4). Размер номера не должен превышать 2 мм в диаметре. После этого матку помещают в пересылочный пакет, снабженный кормом (канди) вместе с 6–10 пчелами, который закрывают крышкой, и в таком виде поступает на реализацию.

Каждая матка, предназначенная для реализации, имеет сертификат, где указывается номер матки, дата вывода и начала яйцекладки, вес матки,



Рисунок 2 – Патент на изобретение; золотые медали

Маточники оцениваются на 9–10 день после дачи личинок на воспитание. Отбирают маточники по размеру. В маточниках высотой 1,6 см развиваются преимущественно мелкие матки массой до 180 мг, в маточниках высотой 2,2 см – крупные матки массой более 200 мг. Поэтому все маточники высотой менее 1,9 см следует выбраковывать.

Молодых неплодных маток оценивают и отбирают по комплексу признаков, главным из которых является живая масса (величина). Матка должна иметь большое, округлое по бокам, плавно сужающееся брюшко, равномерную окраску, соответствующую разводимой породе, и большую грудку. Коротких, словно «обрубленных» маток, нехарактерной для породы окраски или с сильно заостренным брюшком выбраковывают. Качество плодной матки оценивают по яйценоскости.

Хорошие молодые матки откладывают яйца без промежутков, подряд во все ячейки, причём все яйца наклонены в одном направлении. На рамке они расположены симметрично, начиная чуть выше центра сота, и распространяются во все стороны равномерно. Печатный расплод у таких маток сплошной. Маток, откладывающих мало яиц или дающих решётчатый (с пропусками) расплод, выбраковывают. Окончательную оценку дают при реализации плодных маток путем их взвешивания и определения живой массы.

Перед спариванием молодых неплодных маток помещают в специальные нуклеусы (маленькие ульи на уменьшенную рамку). Нуклеусы предназначены для содержания маток до их оплодотворения. Для этих же целей можно использовать и обычные ульи, разгороженные сплошными перегородками на отделения, по 2–3 обычные гнездовые рамки в каждом.

Широкое распространение получил 4-местный нуклеусный улей с рамками размером в 1/4 часть от обычной гнездовой рамки (рисунок 3). Он хорошо зарекомендовал себя удобством в работе на матковыводных пасеках.

Нуклеусы устанавливают не ниже 150–200 мм от земли, направленные летками в противоположенное направление вылета рабочих пчел из других ульев на пасеке.

Для заполнения нуклеусов пчелами используются выделенные для этой цели матки-помощницы или пользовательные семьи.

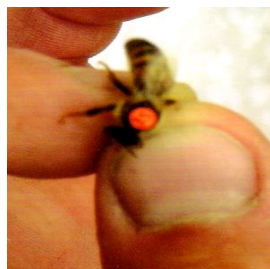


Рисунок 3 – Осмотр нуклеуса Рисунок 4 – Меченая пчелиная матка

порода, линия, номер материнской семьи (отцовской в случае инструментального осеменения), название пасеки, руководитель или пчеловод, дата выдачи и название организации, выдавшей сертификат [4].

На основе проведенных исследований нами была усовершенствована технология вывода пчелиных маток на матковыводных пасеках Республики Молдова, что существенно положительно повлияло на улучшение качества маток местных карпатских пчел.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование технологии вывода пчелиных маток, которая включает ежедневную подкормку семей-воспитательниц с момента постановки прививочной рамки и до запечатывания маточников, из расчета 1 л сахарного сиропа с кормовой добавкой на одну пчелиную семью, обеспечивает стимуляцию приема привитых личинок на выращивание, увеличение длины, диаметра и веса маточников, неплодных и плодных маток.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Eremia, N. *Apicultura*. Chişinău, 2009, – 350 p.
- 2 Eremia, N., Zagareanu, A. *Metodă de creştere a mătcilor. Brevet de invenţie de scurtă durată*. Chişinău, 2012, nr. 567.
- 3 Eremia, N., Crasocico, P., Zagareanu, A., Bahcivanji, M., Caisîn, L., Covalenco A., Eremia, N. *Procedeu de creştere a familiilor de albine. Brevet de invenţie de scurtă durată*. Chişinău, 2012, nr. 538.
- 4 Еремия, Н., Загареану, А. *Технология выращивания пчелиных маток: рекомендации* / Н. Еремия, А. Загареану [и др.]. – Кишинев, 2014. – 28 с.

УДК 639.312:631.8

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ПРЕСНОВОДНЫХ ВОДОЕМОВ

П.А. КРАСОЧКО¹, Д.С. БОРИСОВЕЦ¹, Т.А. ЗУЙКЕВИЧ¹,
А.М. МОРОЗОВ¹, Т.М. ПРОКОПЕНКОВА¹, И.Н. ДЕРЕВЯНКО²

¹ РУП «Институт экспериментальной ветеринарии
им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, РБ

² Белорусский государственный университет, г. Минск, РБ

Поступила в редакцию 16.10.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Для создания пробиотического препарата необходимо, чтобы микроорганизмы, входящие в его состав, обладали свойствами, которые позволят им выполнять функции по стимулированию иммунитета, не были патогенными и обладали антагонистическими свойствами по отношению к патогенным микроорганизмам [4].

В последнее время в сельском хозяйстве часто используют пробиотические препараты, что засоряет биогеоценоз промышленными штаммами. В связи с этим выделение природных штаммов из изолятов, находящихся возле животноводческих комплексов, стало практически невозможным.

Для решения данной проблемы в качестве источников природных штаммов могут стать природные изоляты, которые находятся относительно далеко от сельскохозяйственных угодий и животноводческих комплексов.

Целью работы является выделение из пресноводных водоемов, идентификация и изучение свойств природных микроорганизмов, перспективных для конструирования пробиотических препаратов для сельскохозяйственных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводились в отделе вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». При выполнении научно-исследовательской работы были использованы тест-штаммы бактерий (*E.coli*, *Salm. dublin*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staph. epidermidis*), депонированные в коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

В качестве объекта исследования были использованы образцы донных отложений пресноводного водоема, находящегося в Лельчицком районе Гомельской области Республики Беларусь.

Предметом исследований являлся видовой состав перспективных в пробиотическом отношении изолятов рода *Bacillus*, их ферментативные и антибактериальные свойства.

В качестве селективной среды для выделения бактерий рода *Bacillus* использовалась *Spizizen's minimal salts* [1]. Выделение и идентификацию

бактериальных изолятов проводили согласно схеме выделения и идентификации Желдакова Р.А. [2]. Определение их ферментативных и антибактериальных свойств – согласно схеме Лысак В.В., Желдакова Р.А. [3]. Идентификацию выделенных изолятов проводили на автоматическом микробиологическом анализаторе VITEK 2 compact.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Данные, полученные при проведении серии опытов по выделению, идентификации, ферментативных и антибактериальных исследований, представлены в таблицах 1–4.

Таблица 1 – Грампринадлежность и наличие спор у полученных бактериальных изолятов

Изолят	Грампринадлежность	Наличие спор	Форма клеток
105-1 (2)	+	+	длинные, тонкие, септированные палочки
105-2	+	+	длинные, толстые палочки
105-3 (3)	+	+	короткие, септированные палочки
Г1-5	+	+	средние палочки с утолщением на конце (теннисная ракетка)
CB1-3	+	+	короткие, септированные палочки

Примечание – «–» отсутствие спор, «+» наличие спор

Все выбранные изоляты являются грамположительными, спорообразующими и имеют форму палочек, кроме штамма Г1-5, который имеет форму теннисной ракетки. В связи с этим все изоляты были выбраны для идентификации.

Таблица 2 – Результаты идентификации выделенных микроорганизмов на автоматическом микробиологическом анализаторе VITEK 2 compact

Изолят	Идентификационное название	Степень идентификации
105-1 (2)	<i>Bacillus licheniformis</i>	93%
105-2	<i>Bacillus subtilis</i>	94%
105-3 (3)	<i>Bacillus subtilis</i>	93%
CB1-3	<i>Bacillus cereus</i>	91%
Г1-5	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	92%

Таблица 3 – Амилолитическая, целлюлолитическая и протеолитическая активность выделенных изолятов

Изолят	Целлюлолитическая активность	Амилолитическая активность	Протеолитическая активность
<i>B. subtilis</i> 105-2	+	+	+
<i>B. subtilis</i> 105-3(3)	+	+	+
<i>B. licheniformis</i> 105-1 (2)	+	+	+
<i>B. cereus</i>	–	–	+
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	+/-	–	+

Примечание – «–» отсутствие проявления активности; «+» наличие активности; «+/-» слабое проявление активности

Из таблицы 3 видно, что изоляты *B. subtilis* 105-2, *B. subtilis* 105-3 (3) и *B. licheniformis* 105-1 (2) обладают всеми тремя активностями, *Lysinibacillus sphaericus* обладает выраженной протеолитической активностью и слабовыраженной целлюлолитической активностью, а *B. cereus* обладает только протеолитической активностью.

Таблица 4 – Антагонистическая активность выделенных микроорганизмов в отношении патогенных и условно-патогенных возбудителей желудочно-кишечных инфекций телят и поросят

Изолят	<i>E.coli</i>	<i>Salm. dublin</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staph. epidermidis</i>
<i>B. subtilis</i> 105-2	–	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i> 105-3 (3)	+	+	+	+	–
<i>B. licheniformis</i> 105-1 (2)	+	+	–	–	+
<i>B. cereus</i>	–	–	–	–	–
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	–	–	–	–	–

Примечание– «–» отсутствие проявления активности; «+» наличие активности

Как показано в таблице 4, наиболее выраженная антагонистическая активность отмечалась у изолятов *B. subtilis* 105-2 и *B. subtilis* 105-3 (3), которые угнетали рост четырех из пяти патогенных тест-культур. Выделенный изолят *B. licheniformis* 105-1 (2) проявлял антагонистическую активность по отношению к *E.coli*, *Salm. dublin* и *Staph. epidermidis*, в то же время изоляты *Bacillus cereus* и *Lysinibacillus sphaericus* не проявляли антагонистической активности в отношении данных тест-культур.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе исследований выделено 5 природных изолятов бактерий из донных отложений пресноводного водоема, идентификационный анализ которых позволил отнести их к роду *Bacillus*.

Для выделенных изолятов *B. subtilis* 105-2 и *B. subtilis* 105-3 (3) и *B. licheniformis* 105-1 (2) установлена выраженная амилолитическая, целлюлолитическая и протеолитическая активность.

Результаты изучения антагонистической активности выделенных микроорганизмов в качестве перспективных в пробиотическом отношении позволяют рекомендовать изоляты *B. subtilis* 105-1 (2) и *B. subtilis* 105-3 (3).

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Anagnostopoulos, C. and Spizizen, J. (1961) Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* – Vol. 81. – P. 741–746.
- 2 Выделение и идентификация микроорганизмов / Авт-сост. Р.А. Желдакова. – Мн.: БГУ, 2003. – 27 с.
- 3 Лысак, В.В., Желдакова, Р.А. Микробиология: методические рекомендации к лабораторным занятиям, контроль самостоятельной работы студентов. – Мн.: БГУ, 2002. – 97 с.
- 4 Беденко, А. Пробиотики в рационе молодняка крупного рогатого скота: опыты на телятах молочного периода в ФРГ / А. Беденко // Молоко & Корма. Менеджмент. – 2007. – № 4. – С. 32–34.

Раздел 2. ЭПИЗООТОЛОГИЯ

УДК: 619:616-036.22

АНТИРАБИЧЕСКИЕ ВАКЦИНЫ ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ ОБСТАНОВКИ ПО БЕШЕНСТВУ ПЛОТОЯДНЫХ ЖИВОТНЫХ

Н.М. ПУХОВА, А.Я. САМУЙЛЕНКО, С.А. ГРИНЬ,
Ю.И. БАРСУКОВ, Е.А. ШУБИНА

*ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический
институт биологической промышленности», г. Щелково, РФ*

Поступила в редакцию 10.07.2015 г.

Бешенство плотоядных животных несет ответственность за большинство случаев смерти людей от этой инфекции. Поэтому конечной целью контроля бешенства является предотвращение заражения человека. Как и большинство зоонозов, бешенство является очень сложным заболеванием, в частности из-за его широкого глобального распространения, полипатогенности, постоянной трансформации вируса и высокой летальности [1].

С учетом резервуара возбудителя бешенства по Международной классификации болезней (МКБ-10) определены три вида диагноза: лесное бешенство (wild life rabies, код A82.0), городское бешенство (urban rabies, код A82.1) и не уточненное бешенство (код A82.9). Однако не следует считать эти эпидемиологические типы абсолютно обособленными [2].

В России в последние годы наблюдаются эпизоотии бешенства ассоциированного типа. В ряде регионов страны сложились особые демографические, социально-экономические и природно-географические условия, в которых дикие и домашние животные, подвергающиеся мощному антропогенному прессингу, совершают активные естественные и вынужденные миграции (до 50 км), ареалы их распространения не только сближаются, но и постоянно пересекаются. За счет расширения зоны антропогенного влияния дикие животные вынуждены обитать «рядом с человеком», а это в свою очередь приводит к интенсивной циркуляции вируса бешенства между дикими, домашними, сельскохозяйственными животными и человеком. Стало вполне закономерным появление вблизи окраин крупных населенных пунктов, на территориях садоводческих и огородных участков, животноводческих фермах, улицах сел и деревень заболевших бешенством и потерявших осторожность лис. В прессе все чаще стала появляться информация о нападении и покусах людей дикими животными [3].

С другой стороны, охватившая многие города России «зоомания» и при этом безответственность и безнаказанность владельцев домашних животных за поведение и судьбу питомцев, привели к неконтролируемому прогрессирующему увеличению популяции бродячих собак и кошек, как в сельской местности, так и в городах. Бродячие собаки, находясь на полувольном содержании, имеют близость с домашними животными и челове-

ком, а также с бродячими собаками. В свою очередь, бродячие собаки нередко контактируют с одичавшими собаками, места обитания которых распространяются на большие территории (до 10 км), и в эпидемиологическом отношении, как и дикие плотоядные, могут быть носителями бешенства. Их популяции становятся резервуаром бешенства городского типа в антропоургических циклах или основной мишенью бешенства лесного типа в природных циклах, а также вектором передачи инфекции человеку. Бродячие собаки приобретают значение важного фактора эпидемиологического риска и, соответственно, должны стать наиболее контролируемым объектом эпидемиологического надзора. Следует вспомнить, что в прошлом эпизоотии бешенства в Европе всегда совпадали с обилием собак на улице [4, 5].

Во всем мире признано, что вакцинация является наиболее экономически эффективным средством для профилактики и борьбы, и даже искоренения бешенства [6]. Разработаны вакцины парентерального и перорального применения. Во многих странах контроль бешенства у домашних животных успешно решается: разработаны программы вакцинации и высокоэффективные вакцины, ведется учет и чипирование кошек и собак. Ликвидация бешенства диких плотоядных решается с помощью оральных вакцин, но наиболее сложной проблемой во многих странах, неблагополучных по бешенству, является борьба с бешенством бродячих и бездомных животных (рисунок 1).



Рисунок 1 – Вакцинопрофилактика плотоядных животных от бешенства

В России, как и во всем мире, меры по борьбе с эпизоотиями бешенства городского типа разработаны лучше, они более действенны и требуют сравнительно меньших затрат, чем борьба с эпизоотиями природного типа. Отечественные антирабические вакцины для парентерального применения домашним животным, в том числе кошкам и собакам, по своей безопасности и эффективности, соответствуют мировым стандартам и рекомендациям ВОЗ [7]. Это во многом обусловлено действующей системой государственного надзора за качеством иммунопрепаратов. Многие вакцины, сохраняя

свое название, совершенствовались на протяжении десятилетий [8]. Согласно ФЗ №61 от 12.04.2010 г. «Об обращении лекарственных средств» производство лекарственных средств в нашей стране, в том числе ветеринарного применения, приведено в соответствии с «Правилами производства и контроля качества лекарственных средств», утв. приказом Минпромторга России от 14.06.2013, № 916. Также уделяется большое внимание внедрению в производственную практику биопромышленности международных стандартов ИСО и GMP [9].

Сегодня в ветеринарной практике России успешно применяются разработанные сотрудниками ВНИТИБП антирабические вакцины из инактивированного вируса бешенства (штамм «Щелково-51»), культивированного в клетках перевиваемой линии ВНК-21/13, которые внедрены в производство на «Щелковском биокOMBинате» (таблица 1).

Таблица – Антирабические вакцины из вируса бешенства, штамм «Щелково-51», разработанные во ВНИТИБП

Наименование вакцины	Технология
антирабическая инактивированная жидкая культуральная для крупного, мелкого рогатого скота и лошадей (РАБИКОВ)	роллерно-монослойная в стеклянных бутылках
антирабическая инактивированная сухая культуральная для крупного и мелкого рогатого скота +растворитель (СКИАВ+РКАВ)	роллерно-монослойная в стеклянных бутылках
антирабическая инактивированная сухая культуральная для кошек и собак (РАБИКАН)	роллерно-монослойная в стеклянных бутылках
антирабическая инактивированная сухая культуральная адъювант-вакцина для крупного и мелкого рогатого скота (РАБАВАК)	в псевдосуспензии на микроносителях в биореакторах
антирабическая универсальная инактивированная этанол-вакцина для (УНИРЭВ)	в псевдосуспензии на микроносителях в биореакторах
антирабическая инактивированная культуральная сухая ГОА-вакцина для крупного и мелкого рогатого скота	в псевдосуспензии на микроносителях в биореакторах
референс-вакцина (национальный отраслевой стандарт иммуногенности антирабических вакцин)	≥1 МЕ/мл

Таблица 2 – Инновационные антирабические вакцины из вируса бешенства, штамм «Щелково-51», разработанные во ВНИТИБП

Наименование вакцины	Технологическая документация
антирабическая универсальная инактивированная этанол-вакцина для (УНИРЭВ)	Патент № 2366457. Опытнo-промышленный регламент
антирабическая инактивированная культуральная сухая ГОА-вакцина для КРС и МРС	Патент № 2402348. Опытнo-промышленный регламент

Со временем роллерно-монослойное культивирование клеток и вирусов было переведено на суспензионное и псевдосуспензионное (на микроносителях) культивирование в биореакторах [10, 11, 12]. В настоящее время разработаны и проходят производственные испытания новые антирабические вакцины из цельновирионного вируса бешенства, штамм «Щелково-51» (таблица 2).

Для борьбы с бешенством диких плотоядных во всем мире применяются оральные вакцины. Под эгидой ВОЗ была разработана программа исследований по изучению возможности и эффективности пероральной вакцинации диких плотоядных животных антирабическими вакцинами, в которой участвовали научные центры США, Канады, ФРГ, Франции и Швейцарии.

В России пероральная вакцинация диких плотоядных животных находится в стадии «широкого эксперимента» [13]. Условия для ее проведения в нашей стране значительно отличаются от Западной Европы. Наличие густо заросших лесами громадных территорий, способствующих подвижности хищников, и региональных климатических особенностей вызывают определенные трудности. Тем не менее, уже накоплен некоторый опыт применения отечественных и зарубежных оральных вакцин. С 1997 г. прошли испытания вакцин *Lyssvulpen* (Bioveta Ivanovice, Czech Republic), Fuchsoral (ITD Biologika GmbH, Germany), Синраб (ФГУ ВНИИЗЖ) и Оралрабивак (Покровский завод биопрепаратов), вакцина из штаммов ТС-80 и Внуково-32 (ВНИИВВиМ). В настоящее время в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014)» проводится анализ эффективности применения этих вакцин с целью определения наиболее безопасных и эффективных.

Первые результаты применения оральных вакцин показали их значительную эффективность, но при этом были выявлены и некоторые недостатки: остаточная вирулентность для некоторых видов животных, нестабильность в природных условиях, ограниченные сроки годности и др. Это послужило основанием для исследования новых подходов к конструированию безопасных вакцин. Был разработан алгоритм и определены основные требования, которым должна соответствовать вакцина для перорального применения [14]: не вызывать рабическую инфекцию, выделяться со слюной и повышать свою вирулентность; для эффективной и гарантированной вакцинации приманка с вакциной должна иметь соответствующий цвет, размер, форму, структуру, запах и вкус, чтобы привлекать целевых животных и вызывать у них желание к поеданию (рисунок 2). При выборе компонентов приманки следует учитывать физиологические особенности целевых животных, чтобы при пероральном употреблении вакцины обеспечивался должный контакт вируса с иммунокомпетентными клетками в области ротовой полости и глоточного кольца.

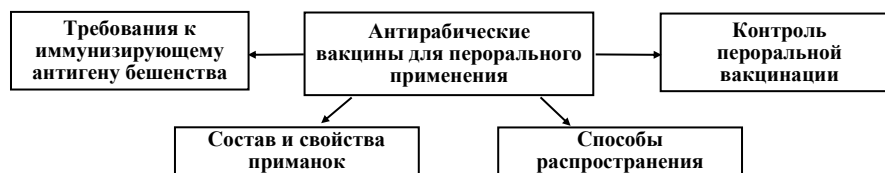


Рисунок 2 – Алгоритм разработки антирабических вакцин перорального применения

От приманки требуется механическая прочность, термостабильность и водостойкость. Большое значение имеет количество и способ распределения вакцинных приманок на обширных неблагоприятных по бешенству территориях. Для более успешной и экономически оправданной оральной вакцинации диких плотоядных, необходимы предварительные эпизоотические исследования природных очагов [15].

Основным контролем эффективности пероральной вакцинации у диких плотоядных является определение уровней антирабических ВНА в пробах сывороток крови. Косвенными критериями для контроля может также служить наличие скоплений тетрациклина (маркера поедаемости вакцинной приманки) в тканях зубов и костей животных, а также наличие или отсутствие случаев бешенства животных [16].

Успех оральной вакцинации в борьбе с бешенством диких плотоядных за рубежом и полученный опыт в России вызывают в целом оптимизм для стабилизации эпизоотической обстановки по бешенству плотоядных. Однако этот метод требует серьезного совершенствования: создание новых высокоэффективных биологически и экологически безопасных вакцин в привлекательных и надежных по физическим показателям приманках, отработка методов распространения приманок и учета поедаемости, разработка надежных методов контроля вакцинации.

Остается серьезным пробелом в борьбе с бешенством группа безнадзорных животных, представляющих в настоящее время наибольшую эпидемическую опасность. В комплекс мероприятий, проводимых для профилактики и ликвидации очагов бешенства, длительное время был включен их отлов и уничтожение. Ежегодно убивали сотни тысяч бродячих собак. Однако, не смотря на все усилия, каких-либо видимых подвижек в ликвидации бешенства не произошло, так как бродячие собаки являются естественным биологическим барьером на пути проникновения в городскую среду диких животных и уменьшают эпизоотическую опасность, как для человека, так и домашних собак [17]. Не эффективно пока работает и программа «отлов-стерилизация-вакцинация-возвращение в среду обитания».

Для стабилизации эпизоотической обстановки по бешенству плотоядных животных в стране требуется интегрированный подход, разработка и тиражирование научно-обоснованной комплексной долгосрочной (на десятилетия) программы с учетом экономических, географических особенностей и эпизоотической обстановки регионов. Совместные усилия административных, жилищно-коммунальных, ветеринарных и медицинских органов должны быть направлены на:

- обязательную регистрацию и чипирование домашних животных,

упорядочение содержания и своевременную вакцинацию против бешенства;

- разработку и внедрение низкодозных эффективных и биологически безопасных антирабических вакцин для домашних животных, способных заменить импортные;
- контроль численности популяции бродячих и бездомных животных, разработку и экстренное внедрение программы «отлов-стерилизация-вакцинация-возврат», создание питомников и активизацию пропаганды среди населения, в том числе детей;
- оральную вакцинацию диких плотоядных животных по показаниям предварительных диагностических исследований;
- разработку высокоэффективных вакцин для перорального применения целевым животным с высоко устойчивыми к погодным условиям и высокой привлекательностью для поедания приманками;
- доставку оральных вакцин с соблюдением условий «холодовой цепи» на всем протяжении логистической цепочки – от производителя до конечного потребителя; практически все вакцины должны храниться и транспортироваться при температуре от +2 до +8 °С;
- разработку высокочувствительных экспресс-методов и диагностических препаратов для проведения контроля оральной вакцинации.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Zinsstag, J. *Human benefits of animal interventions for zoonosis control* // J. Zinsstag [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2007 Apr; 13(4). – P.527–531.
- 2 Пухова, Н.М. Способы борьбы с бешенством плотоядных животных / Н.М. Пухова, А.Я. Самуйленко, Н.К. Еремец, Ю.И. Барсуков, О.А. Захарченко // *Ж. Ветеринария и кормление.* – №4. – 2014. – С.48–50.
- 3 Пухова, Н.М. Основные направления разработки и внедрения антирабических вакцин из шт.Щелково-51 / Н.М. Пухова, А.Я. Самуйленко, В.И. Еремец, Н.К. Еремец, И.В. Иванов [и др.] // *Ветеринарна медицина, вып.95. Міжвідомчий тематичний науковий збірник.* – 2011. – С.175–177.
- 4 Пухова, Н.М. Совершенствование цельновирионных вакцин против бешенства животных / Н.М. Пухова, А.Я. Самуйленко, Н.И. Зенов, С.Н. Красуткин, О.С. Захарченко // *Вет.врач.* – Казань. – 2012. – №5. – С.5–7.
- 5 Пухова, Н.М. Контроль качества антирабических вакцин / Н.М. Пухова, [и др.] // *Методы оценки соответствия.* – 2013. – №12. – С.8–11.
- 6 Пухова, Н.М. Универсальная антирабическая вакцина для животных и критерии ее эффективности / Н.М. Пухова [и др.] // *Известия Самарского научного центра Российской академии наук.* – 2011. – Т.13. – №5 (3). – С.175–177.
- 7 Рыбаков, С.С. Безопасность и иммуногенность оральных антирабических вакцин / С.С. Рыбаков [и др.] // *Ветеринария.* – 2010. – №8. – С.19–22.
- 8 *The oral vaccination of foxes against rabies* // *Report of the Scientific Committee in Animal Health and Animal Welfare.* – 2002/– 55 p.
- 9 Сухарьков, А.Ю. Разработка методов оценки оральной антирабической вакцинации животных: автореф. к.б.н. – Владимир. – 2014. – 25 с.

УДК 619:614.91:57.083.3

КОНТРОЛЬ И МЕРЫ БОРЬБЫ С БЕШЕНСТВОМ СОБАК

О.В. АНИСИНА, В.И. КЛЮКИНА, М.Н. РОМАНЕНКО

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», г. Щелково, РФ

Поступила в редакцию 10.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Ежегодно от бешенства в мире погибает около 70 тыс. человек, главным образом детей, более 95% случаев вызваны укусами зараженных бешенством собак. Ежегодно около 9–12 млн. человек во всем мире получают профилактическое антирабическое лечение после контакта с больными животными. По данным Роспотребнадзора в Российской Федерации за период 2008–2011 гг. зарегистрировано 57 летальных случаев от бешенства среди людей. Регулирование численности безнадзорных собак обычно решается путем сочетания массовой вакцинации, физического уничтожения или хирургической стерилизации. Практика физического уничтожения собак встречает значительный социальный протест из-за негуманности подобных методов и отсутствия доказанной эффективности в борьбе с численностью собак и, как следствие, распространением заболеваний, прежде всего бешенства. Отлов и последующая хирургическая стерилизация является трудоемким и дорогим методом для широкомасштабного применения. В качестве гуманного метода управления популяциями собак в контексте борьбы с бешенством альтернативой физическому уничтожению выступает контроль рождаемости, который может быть более эффективным способом борьбы с болезнями диких животных, а также с бешенством собак [2, 3]. В основе иммуноконtraceпции лежит принцип формирования в организме реципиента иммунитета к собственному гонадотропин-релизинг гормону (ГнРГ) гипоталамуса, что нарушает его выработку и, как следствие, блокирует развитие всего последующего каскада гормональных реакций, приводя к нарушению фертильности и полового поведения. Основанная на данном принципе вакцина GonaConTM в своем иммуноконtraceптивном действии эффективна для обоих полов, разных возрастов и видов животных включая собак, белохвостых оленей, лосей, диких лошадей, свиней, бизонов, кошек, белок и крыс [4, 5, 6] и кроме этого беспрепятственно может применяться с классическими антирабическими вакцинами [2]. Цель исследований заключалась в оценке результатов профилактической вакцинации собак против бешенства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты профилактической вакцинации собак против бешенства оценивали по уровню вируснейтрализующих антител с помощью тест-системы на основе непрямого ИФА [1]. Вакцинацию против бешенства счи-

тали эффективной, если в исследуемой сыворотке содержание антител составляло $\geq 0,5$ МЕ/см³. Пробы сывороток крови (n=124), собранных за 2009–2013 гг., получены от владельческих собак с установленным календарем прививок, привитых отечественными поливалентными вакцинами «Биовак», «Мультикан–4» и от щенков, привитых поливалентной импортной вакциной «Нобивак».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Методом непрямого ИФА исследовали сыворотки крови привитых против бешенства собак домашнего содержания в возрасте от 1 года до 10 лет. В результате проведенных исследований установлено, что уровень вируснейтрализующих антител $\geq 0,5$ МЕ/см³ был определен в сыворотках крови у 100% собак, не зависел от применяемых вакцин и сохранялся до 12–24 месяцев (срок наблюдения). На содержание вируснейтрализующих антител в сыворотках крови влияло количество вакцинаций в прошлом, возраст и наличие хронических заболеваний у собак. В среднем уровень антирабических антител у таких собак находился в пределах от 1,35 до 6,8 МЕ/см³.

У всех щенков на 30-й день после первой вакцинации содержание вирус-нейтрализующих антител в сыворотке крови составило 1,2–3,4 МЕ/см³. Вторичная иммунизация через 6 месяцев индуцировала иммунный ответ у 80% собак более 4,5 МЕ/см³. Анализ сывороток крови безнадзорных уличных собак показал, что у 83,6% собак уровень антирабических антител составил 0,25–0,55 МЕ/см³. Полученные результаты свидетельствуют о неоднородности антирабического иммунитета у собак различного содержания и необходимости проведения серологического обследования вакцинированных собак с целью оптимизации календаря прививок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обязательная ежегодная вакцинация домашних и регулирование численности безнадзорных собак являются основными мерами по ликвидации бешенства в Российской Федерации.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Анисина, О.В. Эпизоотическая ситуация по бешенству животных в Московской области и совершенствование методов экспресс-диагностики. // Автореф. дис. канд. биол. наук. – Щелково, 2013. – 28 с.
 - 2 Carroll, M.J., Singer, A., Smith, G.C. The use of immunocontraception to improve rabies eradication in urban dog populations. *Wildl. Res.*, 2010, 37, 1–12.
 - 3 Самуйленко, А.Я. Инфекционная патология животных / А.Я. Самуйленко, С. А. Гринь [и др.]. – Том II. Бешенство. – Москва, ВНИТИБП. – 2012. – 153 с.
- УДК 619:616.99:636.22/28

ПАЗАРИТОЗЫ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ТЕЛЯТ

В.П. ВАСИЛЬКОВА

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеско-

4 Killian, G., Kreeger, T.J., Rhyan, J., Fagerstone, K.A., Miller, L. *Observations on the use of GnRH immunocontraceptive vaccine in female elk (Cervus elaphus)*. *J. Wildl. Dis.*, 2009, 45, 184–188.

5 Levy, J.K., Friary, J.A., Miller, L.A., Tucker, S.J. Fagerstone, K.A. (2011). *Long-term fertility control in female cats with GonaCon™, a GnRH immunocontraceptive*. *Theriogenology*, 76, 1517–1525.

6 Miller, L.A., Gionfriddo, J., Fagerstone, K.A., Rhyan, J. Killian, G. (2008). *The single-shot GnRH immunocontraceptive vaccine (GonaCon™) in white-tailed deer: comparison of several GnRH preparations*. *Am. J. reprod. Immun.*, 60, 214–223.

го», Минск, РБ

Поступила в редакцию 01.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Высокая концентрация животных на ограниченных площадях, использование для выпаса низменных и болотистых участков, отсутствие смены пастбищ и разновозрастной выпас скота создают оптимальные условия для интенсивного заражения телят различными паразитами – трихостронгилидами, стронгилоидами, эймериями, балантидиями и др. Первым исследователем гельминтофауны жвачных на территории Беларуси являлась А.Ф. Бобкова в 1957 г.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эпизоотическая ситуация при ассоциативных паразитозах желудочно-кишечного тракта телят изучалась в хозяйствах центрального региона Республики Беларусь – в Минском, в Логойском и в Узденском районах; восточного региона – в Осиповичском районе; юго-западного региона – в Барановичском районе. Обследованию были подвержены 2988 телят различных возрастных групп в течение всего календарного года. Изучение динамики инвазирования телят паразитами желудочно-кишечного тракта проводили методами Г.А. Котельникова – В.М. Хренова (1974) – для обнаружения яиц гельминтов и ооцист эймерий; А.М. Петрова и В.Г. Гагарина (1953) – для определения родового состава трихостронгилид (культивирование личинок); Бермана-Орлова (1984) – для выделения личинок. При определении родовой принадлежности трихостронгилид использовали материалы диссертации П.А. Полякова (1953). По методу А.Ф. Манжоса (1982) определяли число балантидий в 1 мл фекалий. Выявление криптоспоридий проводили путем окрашивания мазков фекалий по методу Циль-Нильсена с последующей микроскопией (1998).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В эпизоотологическом отношении правильно рассматривать комплексно экстенсивность и интенсивность инвазии, так как первая дает общее представление об уровне заражения животных, а вот от интенсивности инвазии зависит степень патологических изменений в органах и тканях.

Инвазированность телят паразитами желудочно-кишечного тракта в различных регионах Республики Беларусь. В хозяйствах Минской области заражение телят (экстенсивность инвазии) стронгилоидами составило $41,89 \pm 6,23\%$, трихостронгилидами – $20,20 \pm 2,66\%$, трихоцефалами – $1,71 \pm 0,97\%$, эймериями – $48,84 \pm 11,29\%$, криптоспоридиями – $18,48 \pm 4,22\%$ ($P < 0,05$), балантидиями – $27,41 \pm 6,11\%$. В хозяйствах Могилевской области экстенсивность инвазии телят стронгилоидами составила $36,29 \pm 2,14\%$, трихостронгилидами – $18,42 \pm 1,06\%$, трихоцефалами – $1,17 \pm 0,11\%$, эймериями – $35,42 \pm 9,63\%$, криптоспоридиями – $8,63 \pm 1,47\%$, балантидиями – $16,69 \pm 9,87\%$. В хозяйствах Брестской области уровень заражения телят стронгилоидами составил $47,14 \pm 6,17\%$, трихостронгилидами – $28,76 \pm 3,14\%$ ($P < 0,01$; $P < 0,05$), трихоцефалами – $3,09 \pm 1,01\%$, эймериями – $50,64 \pm 7,41\%$, криптоспоридиями – $15,80 \pm 7,67\%$, балантидиями – $29,73 \pm 5,63$.

Таким образом, сравнивая экстенсивность заражения телят паразитами желудочно-кишечного тракта в различных регионах, мы отметили, что в среднем уровень инвазии стронгилоидами достигал $39,90 \pm 6,58\%$, трихостронгилидами – $22,34 \pm 5,17\%$, родовой состав которых был представлен коопериями – $16,31 \pm 3,08\%$, гемонхами – $16,19 \pm 1,44\%$ и трихостронгилами – $6,15 \pm 4,60\%$ с достоверным преобладанием в Брестской области – $11,69 \pm 2,69\%$ ($P < 0,05$ по отношению к Минской области, $P < 0,01$ по отношению к Могилевской области). Экстенсивность заражения телят трихоцефалами во всех обследуемых областях была минимальной из-за особенностей цикла развития и составляла $2,57 \pm 0,71\%$. Уровень инвазированности животных эймериями составлял $45,39 \pm 5,53\%$, балантидиями – $27,01 \pm 3,70\%$, криптоспоридиями – $16,13 \pm 3,30\%$, с преобладанием данной инвазии в Минской области – $18,48 \pm 4,22\%$ ($P < 0,05$) по отношению к Могилевской.

Наиболее высокое заражение телят трихостронгилидами $28,76 \pm 3,14\%$ наблюдалось в хозяйствах Брестской области. Это обусловлено тем, что в юго-западном регионе республики более длительное, тёплое лето и большая часть территории располагается в пределах Полесской низменности, что является благоприятным условием для развития и накопления во внешней среде инвазионных яиц и личинок гельминтов.

Экстенсивность инвазии телят криптоспоридиями преобладала в хозяйствах Минской области – $18,48 \pm 4,22\%$ ($P < 0,05$) по отношению к Могилевской. Высокие показатели зараженности телят криптоспоридиями могут быть связаны с несоблюдением санитарно-гигиенических норм и правил выращивания и содержания телят, а также с отсутствием ветеринарных мероприятий, направленных на проведение профилактической иммуностимулирующей терапии.

Сезонная динамика инвазирования телят паразитами желудочно-кишечного тракта. Стронгилоиды и трихостронгилиды являются геогельминтами, то есть развиваются без участия промежуточных хозяев и, следовательно, заражение телят ими может происходить во все сезоны года, однако уровень инвазии в течение года колеблется.

Установлено, что наибольшая по отношению к зиме, экстенсивность

инвазии стронгилоидами телят была отмечена в осенний период – $42,88 \pm 3,12\%$ ($P < 0,001$) с интенсивностью инвазии $30,13 \pm 10,22$ личинок ($P < 0,05$) в 1 г фекалий соответственно.

Повышение уровня зараженности животных осенью происходило за счет накопления большого количества инвазионных личинок и яиц на выгульных дворах без твердого покрытия. Наблюдаемая в весенний период стронгилоидозная инвазия была причиной снижения естественной резистентности животных и активизации ингибированных личинок в организме животных. Изменения показателей зараженности телят в течение года возможно связано с непродолжительным сроком жизни половозрелых нематод и формированием приобретенного нестерильного иммунитета.

Максимальная зараженность трихостронгилами телят наблюдалась осенью – $27,66 \pm 5,09\%$ ($P < 0,01$). В летний период нами было выделено наибольшее (по отношению к зиме) количество личинок в 1 г фекалий ($8,18 \pm 1,92$ личинок ($P < 0,05$)) у $25,34 \pm 3,13\%$ ($P < 0,001$) обследованных телят. Родовой состав личинок во все сезоны года однотипный. Интенсивность инвазии в летний период коопериями составила $6,46 \pm 0,98$ личинок в 1 г фекалий, гемонхами и трихостронгилами – $4,11 \pm 0,61$ и $1,93 \pm 0,53$ личинок в 1 г фекалий соответственно.

Пик инвазии в начале осени является результатом накопления большого количества инвазионных элементов паразита в подстилке.

Наибольшее количество (по отношению к весеннему периоду) выделенных яиц трихоцефал ($2,65 \pm 0,55$ в 1 г фекалий ($P < 0,05$)) было обнаружено у $2,35 \pm 0,63\%$ ($P < 0,01$; $P < 0,001$) обследованных телят в осенний сезон года. Это объясняется тем, что максимальная обсемененность внешней среды яйцами трихоцефал обычно отмечается осенью в связи с достижением трихоцефалами половой зрелости, а из-за гибели большого количества яиц зимой контаминация внешней среды весной была минимальной.

Эймериозная инвазия отмечалась с незначительными колебаниями во все сезоны года: наибольшее, по отношению к зиме, заражение телят было выявлено в летний период – $44,47 \pm 2,19\%$ ($P < 0,001$) с интенсивностью инвазии $36,56 \pm 5,23$ ооцист в 1 г фекалий.

Инвазированность телят криптоспоридиями характеризовалась спадом в летнее время ($1,39 \pm 0,39\%$ ($P < 0,001$)) и подъемом в зимнее ($13,23 \pm 1,67\%$ ($P < 0,001$)) с интенсивностью инвазии $41869,86 \pm 4634,7$ ооцист в 1 г фекалий ($P < 0,001$), в весенний период наблюдалось максимальное количество ооцист криптоспоридий – $55389,69 \pm 11206,37$ ($P < 0,001$).

Выделение телятами цист балантидий наблюдалось круглогодично с выраженным подъемом до $20,41 \pm 3,96\%$ ($P < 0,05$) в осенний период по отношению к летнему с интенсивностью инвазии $1924,81 \pm 122,89$ ($P < 0,001$) цист балантидий в 1 мл фекалий.

Высокие показатели зараженности телят паразитами желудочно-кишечного тракта можно объяснить несоблюдением санитарно-гигиенических норм и правил содержания животных, отсутствием профилактических обработок и благоприятными для паразитов условиями внешней среды.

Возрастная динамика инвазирования телят паразитами желу-

дочно-кишечного тракта. С первого дня жизни телята инвазированы криптоспоридиями с экстенсивностью инвазии $14,14 \pm 4,09\%$ ($P < 0,01$) и интенсивностью инвазии $3819,38 \pm 831,61$ ооцист в 1 г фекалий. Далее наблюдалось увеличение уровня зараженности и пик инвазии ($25,92 \pm 1,29\%$ ($P < 0,01$)) наступил в 16–20-дневном возрасте телят с интенсивностью инвазии – $39796,22 \pm 4049,58$ ооцист в 1 г фекалий ($P < 0,001$). Минимальное количество ооцист криптоспоридий – $1896,0 \pm 472,0$ в 1 г фекалий ($P < 0,05$) было выявлено у $0,43 \pm 0,14\%$ ($P < 0,001$) телят 121 – 180-дневного возраста.

С месячного возраста помимо криптоспоридиозной инвазии у телят выявили стронгилоиды, эймерии и балантидии с экстенсивностью инвазии – $23,50 \pm 1,36\%$, $45,29 \pm 4,69\%$, $16,31 \pm 1,14\%$ соответственно. Стронгилоидозная инвазия достигла своего максимума $41,26 \pm 3,90$ личинок ($P < 0,01$) в 1 г фекалий у $52,81 \pm 1,79\%$ ($P < 0,001$) обследованных телят 91 – 120-дневного возраста. В возрастной группе 121 – 180 дней интенсивность инвазии телят составила $31,80 \pm 2,35$ личинок в 1 г фекалий, а экстенсивность инвазии – $49,26 \pm 4,36\%$ ($P < 0,001$), что в 2,09 раз больше, чем в группе телят в возрасте 31 – 60 дней.

К 91–120-дневному возрасту интенсивность инвазии телят эймериями и балантидиями составляла $41,25 \pm 5,16$ ооцист эймерий ($P < 0,05$) в 1 г фекалий у $49,48 \pm 3,69\%$ и $1893,65 \pm 123,76$ цист балантидий ($P < 0,001$) в 1 мл фекалий у $25,42 \pm 4,06\%$ обследованных животных.

Яйца трихоцефал и личинки трихостронгилид впервые были обнаружены у телят, достигших 61–91-дневного возраста. Инвазированность трихостронгилидами составляла $15,91 \pm 2,22\%$ с интенсивностью инвазии $3,61 \pm 0,60$ личинок в 1 г фекалий, трихоцефалами – $2,47 \pm 1,03\%$ с интенсивностью инвазии $1,30 \pm 0,11$ яиц в 1 г фекалий. Максимальное количество яиц трихоцефал ($1,95 \pm 0,18$ яиц в 1 г фекалий ($P < 0,01$)) было обнаружено у $3,32 \pm 0,94\%$ телят 121–180-дневного возраста.

Родовой состав трихостронгилид у телят 61–90 дневного возраста был представлен коопериями и гемонхами с уровнем инвазии $14,14 \pm 2,17\%$ и $11,11 \pm 1,30\%$ соответственно. Личинки трихостронгил были выделены у телят 91–120-дневного возраста.

С возрастом трихостронгилидозная инвазия увеличивалась, и к 121–180-дневному возрасту интенсивность выделения кооперий составила $9,67 \pm 2,42$ личинок ($P < 0,01$) в 1 г фекалий у $24,70 \pm 3,21\%$ ($P < 0,01$), гемонхов – $6,82 \pm 1,93$ личинок ($P < 0,01$) в 1 г фекалий у $16,08 \pm 2,71\%$, трихостронгил – $2,82 \pm 0,22$ личинок ($P < 0,001$) в 1 г фекалий у $11,69 \pm 1,61\%$ ($P < 0,001$) инвазированных животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1 Инвазированность телят в различных регионах Республики Беларусь стронгилоидами составляла $39,90 \pm 6,58\%$, трихостронгилидами – $22,34 \pm 5,17\%$, трихоцефалами – $2,57 \pm 0,71\%$, эймериями – $45,39 \pm 5,53\%$, криптоспоридиями – $16,13 \pm 3,30\%$ и балантидиями – $27,01 \pm 3,70\%$.

2 В осенний период наблюдается высокое заражение телят стронгилоидами, трихостронгилидами, трихоцефалами и балантидиями, в зимний

и весенний – криптоспоридиями, в летний период – эймериями.

3 С первого дня жизни телята инвазированы криптоспоридиями с экстенсивностью инвазии $14,14 \pm 4,09\%$. С месячного возраста, помимо криптоспоридиозной инвазии, у телят выявили стронгилоиды, эймерии и балантидии. Яйца трихоцефал и личинки трихостронгилид впервые были обнаружены у телят, достигших 61–91-дневного возраста.

ЛИТЕРАТУРА

1 Бобкова, А.Ф. Гельминтофауна домашних животных и свиней зоны белорусского Полесья / А.Ф. Бобкова // I научно-координационное совещание по паразитарным проблемам Литовской ССР, Латвийской ССР, Эстонской ССР и Белорусской ССР: тезисы докладов, Вильнюс, 3 – 4 октября 1957 г. – Вильнюс, 1957. – С. 99 – 100.

2 Якубовский, М.В. Особенности эпизоотологии и современные препараты для терапии и профилактики паразитарных болезней животных / М.В. Якубовский // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. – 2005. – № 2. – С. 9 – 14.

УДК: 619: 616. 995. 1

ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТЫЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ТЕРАПИИ ПАРАЗИТАРНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ

Н.Ю. ЩЕМЕЛЕВА

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

Поступила в редакцию 07.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Терапия паразитарных болезней животных предполагает применение различных химиотерапевтических средств, которые являются не безразличными для организма. В настоящее время известны десятки противопаразитарных средств, но только некоторые из них относительно безопасны - не вызывают угнетения иммунитета и обменных процессов в организме животного. В литературе имеются многочисленные сообщения о том, что антигельминтные препараты, такие как клозантел, мебендазол, ивермектин, тетрализол и др., даже в терапевтических дозах оказывают мощное иммуносупрессивное действие на организм животных. Кроме того неоднократное их применение вызывает привыкание со стороны паразитов, и последующее заражение ими на фоне ослабленного иммунитета приводит не только к значительному снижению продуктивности, но и падежу животных [1, 4].

УДК 619:616.98:578.822.2-08-039.71

ЛЕЧЕБНАЯ И ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРО- И ПРЕБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЭНТЕРИТАХ ТЕЛЯТ

П.А. КРАСОЧКО, Д.С. БОРИСОВЕЦ, Т.А. ЗУЙКЕВИЧ,
В.В. ЧЕРНЯК, А.М. МОРОЗОВ

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

Поступила в редакцию 16.10.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из путей решения проблемы обеспечения высокой интенсивности роста и резистентности телят является использование пробиотических препаратов на основе симбионтных бактерий – нормальных обитателей желудочно-кишечного тракта животных, являющихся многофакторным средством, обладающим не только антагонистической активностью и конкурентным вытеснением условно-патогенных микроорганизмов, но и способствующим нормализации иммунологических процессов за счет усиления синтеза иммуноглобулинов, лизоцима, интерферона, активизации макрофагов и других факторов защиты животных [1, 3].

Исследование влияния пробиотиков на организм животных показывает, что они, в отличие от антибиотиков, не оказывают отрицательного воздействия на нормальную микрофлору, поэтому их широко применяют для профилактики и лечения дисбактериозов. Важной особенностью пробиотиков является их способность повышать резистентность организма, регулировать и стимулировать пищеварение и, как следствие, способствовать повышению продуктивности животных [2, 4].

В связи с этим проводимые в этом направлении исследования на основе разработки и применения новых препаратов, обладающих более высокой биологической активностью, устойчивых к перевариванию, а также имеющих повышенный в сравнении с обычными пробиотиками срок хранения, являются весьма актуальными и представляют большой научный и практический интерес.

Цель работы – изучение лечебно-профилактической эффективности про- и пребиотических препаратов при инфекционных энтеритах телят, а также влияния вышеуказанных препаратов на интенсивность роста и неспецифическую резистентность молодняка крупного рогатого скота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводились на базе отдела вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», лаборатории интенсивных технологий производства говядины РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству», СПК «Острошицы» Логойского района Минской области.

Предметом исследований явилась лечебная и профилактическая эффективность пробиотика «Лактимет» и пребиотика «Глюкофарм».

Пробиотический препарат «Лактимет» сконструирован на основе штаммов микроорганизмов *Lactobacillus rhamnosus* и *Bifidobacterium adolescentis* в отделе вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

В состав пребиотика «Глюкофарм» (производства ООО СП «Ветинтерфарм», РБ) входят дисахариды и инертный растворитель.

С целью определения влияния разработанного пробиотического препарата «Лактимет» и пребиотика «Глюкофарм» на интенсивность роста и неспецифическую резистентность молодняка крупного рогатого скота были сформированы 2 группы телят возрастом 2–3 дня по принципу аналогов по 50–75 голов в группе. Телятам опытной группы №1 внутрь задавался пробиотический препарат «Лактимет» в дозе 10,0 см³ и пребиотик «Глюкофарм» в дозе 7,0 см³ на голову с питьевой водой из расчета 1 доза на 100,0 мл воды в первый и третий дни жизни и в дни отъема. Телятам контрольной группы выпаивали изотонический раствор натрия хлорида. Продолжительность исследований – 60 дней.

В сыворотке крови телят определяли бактерицидную активность по Смирновой и Кузьминой (1968), лизоцимную активность – по Дорофейчуку (1966).

Для изучения профилактической эффективности препараты задавались по вышеуказанной схеме опытной группе телят (n=10) в возрасте до 20 дней. Животным контрольной группы (n=12) препараты не применялись.

С целью определения лечебной эффективности препаратов было сформировано 2 группы (опытная и контрольная) больных инфекционными энтеритами телят по 10–15 голов в возрасте до 20 дней. Телятам опытной группы пробиотический препарат задавали перорально в дозе 10,0 см³ на голову 1 раз в день 2–3 дня подряд, пребиотик «Глюкофарм» – с питьевой водой в дозе 0,25 см³ на 1 кг массы тела однократно в день в течение 10–15 дней.

Подопытные животные всех групп содержались в условиях технологии, принятой в хозяйстве. В период исследований проводился контроль за состоянием здоровья животных, при этом учитывалось общее состояние телят: аппетит, поедаемость кормов, двигательная активность.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Данные, полученные при проведении серии опытов по определению влияния препаратов «Лактимет» и «Глюкофарм» на интенсивность роста и неспецифическую резистентность телят, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Влияние пробиотика «Лактимет» и пребиотика «Глюкофарм» на интенсивность роста и неспецифическую резистентность телят

Показатели	Контрольная группа	Опытная группа
количество животных в группе, голов	50	75
продолжительность опыта, дней	60	60
средняя живая масса теленка в начале опыта, кг	27,3±4,3	28,1±3,9
средняя живая масса теленка в конце опыта, кг	58,3±8,5	68,9±7,2
среднесуточный прирост живой массы, г	520±8,82	680±14,32**
бактерицидная активность сыворотки крови, %	48,33±1,0	66,2±1,47***
лизоцимная активность сыворотки крови, мкг/мл	2,9±0,11	3,6±0,13***

Примечание – ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

Из представленных в таблице 1 данных видно, что использование пробиотика «Лактимет» и пребиотика «Глюкофарм» позволяет дополнительно получить среднесуточный прирост живой массы 160 г ($P \leq 0,01$) и дополнительной продукции за период опыта 10,6 кг на теленка. Бактерицидная активность сыворотки крови телят опытной группы была достоверно ($P \leq 0,001$) выше животных группы контроля на 17,87%, лизоцимная – на 0,7 мкг/мл ($P \leq 0,001$).

Результаты изучения профилактической эффективности препаратов представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Профилактическая эффективность применения препаратов «Лактимет» и «Глюкофарм» на базе СПК «Острошицы» Логойского района Минской области

Показатели	Опытная группа	Контрольная группа
доза препарата, мл	10	–
количество животных в группе, гол	11	10
количество заболевших телят (гол./%)	1/9,1	6/60
количество павших телят (гол./%)	0/0	1/10
эффективность	90,9	–

Приведенные в таблице 2 данные показывают, что применение препаратов «Лактимет» и «Глюкофарм» для профилактики энтеритов телят позволяет снизить заболеваемость данной патологией на 51,9% и на 10% повысить сохранность. Профилактическая эффективность применения препаратов составила 90,9%.

Данные по изучению терапевтической эффективности применяемых про- и пребиотических препаратов представлены в таблице 3.

Комплексное применение вышеуказанных препаратов позволяет сократить длительность заболевания телят инфекционными энтеритами на 6,2 дня, на 50% повысить сохранность, а также снизить вероятность рецидивов на 40%.

Таблица 3 – Терапевтическая эффективность применения препаратов «Лактимет» и «Глюкофарм» на базе СПК «Острошицы» Логойского района Минской области

Показатели		Опытная группа	Контрольная группа
количество животных в группе, гол		10	10
длительность заболевания, дней		2,0±0,43	8,2±0,7
пало	гол	1	6
	%	10	60
повторно заболело	гол	0	2
	%	0	40

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для стимуляции интенсивности роста, повышения естественной резистентности организма телят, нормализации микробиоценоза в раннем постнатальном онтогенезе, а также с профилактической целью рекомендуется комплексно применять пробиотический препарат «Лактимет» в дозе 10,0 см³ и пребиотик «Глюкофарм» в дозе 7,0 см³ в первый и третий дни жизни и однократно перед переводом телят из родильного отделения. С лечебной целью пробиотик «Лактимет» рекомендуется применять перорально в дозе 10,0 см³ на голову 1 раз в день 2–3 дня подряд, пребиотик «Глюкофарм» – с питьевой водой в дозе 0,25 см³ на 1 кг массы тела однократно в день в течение 10–15 дней.

Совместное использование препарата «Лактимет» и пребиотика «Глюкофарм» позволяет повысить среднесуточный прирост живой массы телят на 160 г ($P \leq 0,01$), а также показатели неспецифической резистентности организма животных: бактерицидную активность сыворотки – на 17,87% ($P \leq 0,001$), лизоцимную – на 0,7 мкг/мл ($P \leq 0,001$).

Комплексное применение препаратов позволяет снизить заболеваемость, повысить сохранность, сократить длительность заболевания и вероятность возникновения рецидивов. Профилактическая эффективность применения препаратов составила 90,9%.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Пестис, В.К. Пробиотики в животноводстве и ветеринарии / В.К. Пестис, М.А. Каврус, А.Н. Михалюк. – Гродно: Гродн. гос. аграр. ун-т, 2006. – 94 с.
- 2 Каврус, М.А. Гигиенические аспекты использования пробиотических препаратов в животноводстве / М.А. Каврус, В.В. Малашко // Ветеринар. наука – пр-ву. – 2005. – № 38. – С. 242–246.
- 3 Олива, Т.В. Производство экологически безопасной продукции животноводства путем направленного формирования бактериоценоза кишечника молодняка животных / Т.В. Олива // Мировой опыт и перспективы развития сельского хозяйства: материалы Междунар. конф., посвящ. 95-летию Воронеж. гос. аграр. ун-ту, Воронеж, 23–24 окт. 2007 г. / Воронеж. гос. аграр. ун-т. – Воронеж, 2008. – С. 115–117.
- 4 Беденко, А. Пробиотики в рационе молодняка крупного рогатого скота: опыты на телятах молочного периода в ФРГ / А. Беденко // Молоко & Корма. Менеджмент. – 2007. – № 4. – С. 32–34.

Поэтому изыскание и создание современных экологически чистых препаратов, которые наряду с антгельминтным действием, обладали иммуностимулирующими, антиоксидантными свойствами, не накапливались в организме животного и животноводческой продукции, является первостепенной задачей для ветеринарной науки.

При профилактике паразитарных болезней, наряду с традиционными антгельминтиками, нашли применение и иммуностимуляторы – иммунопаразитан, левамизол, полиоксидоний, градекс, Т- и В- активин и многие другие [2]. Эти препараты стимулируют в организме животных определенные звенья иммунитета, что позволяет бороться с паразитами за счет естественных сил организма и длительно поддерживать невосприимчивость к возбудителям инвазионных болезней. Поэтому вполне обосновано изучение эффективности применения неспецифических стимуляторов для терапии и профилактики паразитозов.

Нами проведены исследования терапевтической эффективности экологически чистых препаратов – иммуностимулятора «Тималин» при фасциолезе коров, комплексного иммуностимулирующего препарата «Янсеvit» при ассоциативных паразитозах и криптоспориidioзе крупного рогатого скота и нового иммуностимулятора «Иммуновeт» на основе бактериального липополисахарида при стронгилоидозе и стронгилятозах желудочно-кишечного тракта телят.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение эффективности тималина, янсевита и иммуновeта при различных паразитарных болезнях крупного рогатого скота – фасциолезе и ассоциативных паразитозах желудочно-кишечного тракта – проводили в животноводческих хозяйствах республики и в отделе паразитологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Обследование животных на наличие цист балантидий проводили методом А.Ф. Манжоса (1984) на эймериоз и ассоциативные нематоды желудочно-кишечного тракта – методом Г.А. Котельникова – В.М. Хренова (1974) определение родового состава нематод после культивирования по Полякову П.А. (1953).

Определение яиц фасциол проводили методом последовательных смывов.

Обследование телят на криптоспориidioз проводили методом нативного мазка фекалий с окраской по Циль-Нильсену с последующей микроскопией [3].

Тималин – препарат полипептидной природы, получаемый путем экстракции из тимуса крупного рогатого скота. Тималин стимулирует клеточный иммунитет (регулирует количество и соотношение Т-лимфоцитов, стимулирует реакции клеточного иммунитета), усиливает фагоцитоз, процессы регенерации и кроветворения в случае их угнетения.

Испытания эффективности тималина проводили в СФ «Пуховичский» Пуховичского района Минской области на коровах в возрасте 4–6 лет. Для чего было сформировано две группы животных (опытная и контрольная).

Животным опытной группы в количестве 20 голов вводили тималин внутримышечно в дозе 0,2 мг/кг массы тела по АДВ один раз в сутки в течение трех дней.

Животным контрольной группы, спонтанно инвазированным фасциолами, в количестве 20 голов препарат не применяли.

Эффективность препарата определяли путем гельминтооовоскопических исследований через 45 дней после лечения.

Янсевит – комплексный иммуностимулирующий препарат, который представляет собой порошок белого или светло-желтого цвета, в 1 г которого содержится 500 мг фумаровой кислоты, 300 мг янтарной кислоты, 40 мг токоферола ацетата и лактозы до 1000 мг.

В ветеринарной практике янсевит применяется в качестве иммуностимулятора для лечения и профилактики иммунодефицитных состояний, возникающих на фоне паразитарных болезней крупного и мелкого рогатого скота.

Препарат применяют индивидуально с кормами в следующих дозах:

- при *стронгилоидозе, стронгилятозах желудочно-кишечного тракта, эймериозах, балантидиозе* животных назначают внутрь в дозе 0,1 г/кг массы тела один раз в сутки три дня подряд;

- при *криптоспориidioзе* назначают внутрь в дозе 0,1 г/кг массы тела один раз в сутки пять дней подряд.

Мясо сельскохозяйственных животных для пищевых целей можно использовать без ограничений после применения препарата.

Исследование эффективности комплексного препарата «Янсевит» при ассоциативных паразитозах крупного рогатого скота (ассоциативные нематодозы желудочно-кишечного тракта, эймериозы, балантидиоз, криптоспоридиоз) провели в ГП «Пуховичское» Пуховичского района Минской области и РУ ЭО СХП «Восход» Минского района Минской области.

В ГП «Пуховичское» провели испытание эффективности препарата-иммуностимулятора «Янсевит» при ассоциативных нематодозах желудочно-кишечного тракта, эймериозе и балантидиозе у телят в возрасте 2–4 месяцев.

Обследование животных на наличие цист балантидий, эймерий и на ассоциативные нематоды желудочно-кишечного тракта проводили вышеуказанными методами.

Для испытания эффективности иммуностимулирующего препарата «Янсевит» были сформированы опытная и контрольная группы телят.

Животным опытной группы в количестве 30 голов применили внутрь препарат «Янсевит» в дозе 0,1 г/кг живой массы один раз в сутки три дня подряд. Контрольной группе телят в количестве 20 голов препарат не применяли.

РУ ЭО СХП «Восход» Минского района Минской области провели испытание эффективности препарата «Янсевит» при криптоспориidioзе телят в возрасте 9–15 дней.

Из телят, спонтанно инвазированных криптоспоридиями сформировали 2 группы – опытную и контрольную.

Животным опытной группы (36 голов) применяли комплексный препарат «Янсевит» в дозе 100 мг на кг массы тела животного перорально 1 раз в день в течение пяти дней. Группе контроля (12 голов) препарат не применяли.

Иммуновет – иммуностимулирующий препарат, который представляет собой стерильную, слегка опалесцирующую жидкость, в 1 мл которой содержится 500 мкг липополисахарида штамма бактерии *Bacillus subtilis* «КМИЭВ - В 177», а в качестве инертного растворителя деионизированную воду.

Иммуновет стимулирует показатели специфического и неспецифического гуморального иммунитета – лизоцимной, бактерицидной активности сыворотки крови, иммуноглобулинов М, G и А-классов, титр интерферона, усиливает лейкопоз, фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов, повышает количество Т- и В-лимфоцитов.

Определение эффективности иммуностимулятора иммуновета при ассоциативных нематодозах желудочно-кишечного тракта крупного рогатого скота проводили в хозяйстве Логойского района Минской области.

Телят в возрасте 3,5–4 месяцев исследовали на зараженность желудочно-кишечными нематодами, после чего формировали опытную и контрольную группы, 30 голов в каждой.

Телятам опытной группы, спонтанно инвазированной желудочно-кишечными паразитами применили иммуновет в дозе, отработанной ранее в исследованиях по изучению иммуногенности препарата, 10 мкг АДВ/кг живой массы один раз в день три дня подряд.

Контрольной группе препарат не применяли.

Оценку эффективности проводили через 14 дней по наличию в пробах фекалий телят опытной и контрольной групп яиц гельминтов согласно методикам, указанным выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Вначале исследования по изучению эффективности иммуностимулятора «Тималин» против фасциол крупного рогатого скота было установлено исходное заражение коров фасциолами, которое составило 100% как в опытной группе, так и группе контроля. После применения препарата животным опытной группы установлено, что введение тималина в дозе 0,2 мг/кг массы тела в течение трех суток показало освобождение от фасциол 16 животных из 20-ти. Экстенсивность тималина при этом составила 80,0%. Зараженность животных контрольной группы оставалась на том же уровне.

В результате эксперимента по изучению эффективности комплексного препарата «Янсевит» было установлено исходное заражение телят ассоциативными паразитогами желудочно-кишечного тракта, которое составило: балантидиями 76,67%, эймериями – 67,42%, стронгилятами (гемонхи и кооперии) – 81,48%, стронгилоидами – 75,98%.

При обследовании телят через 7 дней после применения препарата эффективность янсевита составила: при стронгилятозах желудочно-кишечного тракта (гемонхи и кооперии) – 81,48%, при стронгилоидозе – 75,98%, эймериозе – 67,42%, при балантидиозе – 76,67%.

В контрольной группе уровень заражения данными паразитами составлял: стронгилятами (гемонхи и кооперии) – 90,0%, стронгилоидами – 50,0%, эймериями – 65,0%, балантидиями – 50,0%.

При исследовании эффективности янсевита против криптоспориозной инвазии телят было установлено исходное заражение (интенсивность инвазии) телят криптоспоридиями в опытной группе – $51,7 \pm 17,5$ тыс. ооцист в 1 г фекалий, в контрольной группе – $16,03 \pm 6,9$ тыс. ооцист в 1 г фекалий. Из клинических признаков отмечалось угнетенное состояние и водянистая диарея.

На 4 день после курса лечения обнаружили только единичные ооци-

сты криптоспоридий в мазках фекалий у 33,30% опытных животных, признаков угнетения и расстройства со стороны деятельности желудочно-кишечного тракта у этих телят не наблюдали. В контрольной группе на конец опыта интенсивность инвазии доходила до $36,4 \pm 16,8$ тыс. ооцист в 1 г фекалий при 100 % экстенсивности инвазии.

Таким образом, экстенсивность применения препарата «Янсевит» с лечебной целью при криптоспориidioзе телят составила 66,7%, интенсивность – 90,0–100 %. При этом отрицательного влияния лечебного препарата на организм животных не установлено.

При проведении опыта по изучению эффективности препарата «Иммуновет» установлено, что исходная экстенсивность инвазии телят опытной группы составляла стронгилоидами – 100%, стронгилятами желудочно-кишечного тракта – 30,3%. Зараженность телят группы контроля составляла стронгилоидами – 100%, стронгилятами желудочно-кишечного тракта – 42,4%.

После применения препарата экстенсивность его составила при стронгилоидозе – 76,7%, при стронгилятозах желудочно-кишечного тракта – 65,0%.

В этот период инвазированность контрольной группы составила – стронгилоидами – 100%, стронгилятами желудочно-кишечного тракта – 66,67%.

ВЫВОДЫ

1 Экстенсивность применения тималина для профилактики и терапии фасциолеза крупного рогатого скота в дозе 0,2 мг/кг живой массы один раз в день три дня подряд составила 80,0%.

2 Эффективность нового экологически чистого комплексного препарата «Янсевит» при ассоциативных паразитозах телят при стронгилятозах желудочно-кишечного тракта (гемонхи и кооперии) – 81,48%, при стронгилоидозе – 75,98%, эймериозе – 67,42%, при балантидиозе – 76,67% и при криптоспориidioзе – 66,70%, отрицательного воздействия на организм животных выявлено не было.

3 Экстенсивность нового иммуностимулятора «Иммуновет» на основе бактериального липополисахарида *B. subtilis* при ассоциативных паразитозах желудочно-кишечного тракта телят в дозе 10 мкг АДВ/кг живой массы один раз в день три дня подряд составила при стронгилоидозе – 76,7%, при стронгилятозах желудочно-кишечного тракта – 65,0%.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Оробец, В.А. Отрицательные последствия дегельминтизации сельскохозяйственных животных / В.А. Оробец // Вести ветеринарии. – 2000. – № 15. – С. 88 – 90.
- 2 Паразитарные зоонозы (монография) / М.В. Якубовский [и др.]; под. ред. М.В. Якубовского. – Минск: Наша Идея, 2012. – 384 с.
- 3 Якубовский, М.В. Диагностика, терапия и профилактика паразитарных болезней животных / М.В. Якубовский, Н.Ф. Карасев. – Минск: БИТ «Хата», 2001. – 382 с.
- 4 Ястреб, В.Б. Побочные эффекты антгельминтиков / В.Б. Ястреб, Т.С. Новик // Восьмой Международный конгресс по проблемам ветеринарной медицины мелких домашних животных, Москва, 6–8 апреля, 2000г. / Рос. с.-х. акад. – Москва,

2000. – C. 172 – 175.

УДК: 619:616.98:616.6:636.4

ПУТИ ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИЙ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ У ПОРОСЯТ

М.А. АНАНЧИКОВ, Ю.В. ЛОМАКО, Л.А. АМОСОВА,
Д.Л. БЕЛЯНКО, С.В. ДАДАШКО

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского»,
г. Минск, РБ*

Поступила в редакцию 14.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Использование в свиноводстве пород свиней мясного направления подразумевает неукоснительное выполнение технологии содержания и выращивания, регулярный мониторинг состояния здоровья животных и профилактические мероприятия, направленные на недопущение инфекционных заболеваний. Наибольшее распространение на свиноводческих комплексах получили респираторные и желудочно-кишечные заболевания молодняка свиней [2], вызываемые условно-патогенной микрофлорой (вирусами и бактериями). Причем в качестве возбудителей, как правило, выступают ассоциации этих микроорганизмов [6], в состав которых могут входить и бактерии, ранее относящиеся к сапрофитам. Возникновение таких заболеваний возможно у поросят и молодняка свиней на фоне снижения резистентности организма под влиянием неблагоприятных факторов окружающей среды [7]. В отдельных специализированных хозяйствах с большим охватом поголовья (75–100%) и высокой летальностью наблюдают заболевание поросят стрептококкозом [3].

Борьба с факторными инфекциями животных затруднена в связи со сложностью разрыва эпизоотической цепи. Применяемые молодняку животных с этой целью антибиотики и химиопрепараты могут оказаться причиной негативных явлений: появление устойчивых форм микробов к антибиотикам, дисбактериоз кишечника, подавление иммунной активности организма, нарушение обмена аминокислот, микро- и макроэлементов и другие [2,5,9]. Включая в схему противоэпизоотических мероприятий химиопрофилактику, следует учитывать фундаментальные основы терапии [8] и последствия влияния антибиотиков на иммунную систему организма [10]. Антибактериальные препараты тогда лишь эффективны, когда они применяются на основе знаний микробного пейзажа в хозяйстве, при этом учитывая антибиотикочувствительность не только патогенных, но и непатогенных микроорганизмов. Вероятно, основным источником возбудителей факторных инфекций являются не клинически больные поросята, а маточное поголовье, от которых инфицируются различными путями всякое новое поколение животных [1].

Цель исследований – изучить распространение условно-патогенных микроорганизмов среди поросят и маточного поголовья на свиноводческих комплексах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работу проводили на свиноводческих комплексах и в лаборатории диагностики РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского». Для проведения бактериологических исследований от супорос-

ных свиноматок отбирали пробы мочи, от павших и вынужденно убитых поросят – патологический материал (паренхиматозные органы). Делали посе- вы на жидкие и твердые питательные среды, культивировали в термостате при температуре 37⁰С в течение 1–2 суток. Из посевов мочи свиноматок и паренхиматозных органов поросят выделяли чистую культуру микроорганиз- мов на дифференциально-диагностических питательных средах с последую- щим определением вида возбудителя и его антибиотикочувствительности с помощью анализатора – Vitek Compact 2. Морфологические и тинкториаль- ные свойства микроорганизмов изучали в мазках-препаратах, окрашенных по Граму; патогенность выделенных культур микроорганизмов – с помощью биопробы на белых мышах.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При бактериологических исследованиях мочи от свиноматок у 100% обследованных животных установлена бактериурия (таблица 1), у отдель- ных – степень бактериурии достигала 5×10⁵ м.к./мл и более, что указывало на воспаление слизистой оболочки мочевого пузыря и почек.

Таблица 1 – Микрофлора мочевыводящих путей у свиноматок

№ п/п	Вид бактерий	Выделяемость микроорганизмов из мочи у глубокосупоросных свиноматок, проб			
		перед 1-ым опоросом (n=16)	2-го опороса (n=18)	3-го опороса (n=23)	4-го опороса (n=30)
1	<i>Escherichia coli</i>	2	9	20	30
2	<i>Escherichia coli: A20</i>	-	3	2	-
3	<i>Staphylococcus simulans</i>	-	-	12	24
4	<i>Staphylococcus xylosus</i>	-	-	9	10
5	<i>Proteus mirabilis</i>	-	1	8	11
6	<i>Streptococcus spp.</i>	-	-	-	3
7	<i>Streptococcus uberis</i>	1	-	-	-
8	<i>Kocuria rosea</i>	11	9	12	19
9	<i>Myroides spp.</i>	4	2	7	10
10	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	12	1	5	28
11	<i>Aerococcus viridans</i>	14	5	8	23
12	<i>Alloiococcus otitis</i>	4	5	3	11
13	<i>Acinetobacter genomospecies</i>	8	-	16	22
14	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	8	11	6	9
15	<i>Aerococcus viridansxylosus</i>	6	7	11	2
16	<i>Bacillus spp.</i>	3	4	7	18
17	<i>Klebsiella spp.</i>	-	-	-	2
18	<i>Salmonella enterica</i>	-	-	1	-
19	<i>Clostridium perfringens</i>	-	1	-	-

Результаты бактериологических исследований мочи свиноматок, представленные в таблице 1, показывают, что микробиоценоз мочевыводящих путей у свиноматок характеризуется широким видовым многообразием условно-патогенных микроорганизмов, являющихся потенциальными возбудителями воспалительных процессов.

Микроорганизмы, изолированные из мочи свиноматок, оказались устойчивыми к большинству широко применяемых с лечебно-профилактической целью антибиотиков. Так, в ходе исследований установлено, что *Escherichia coli* устойчива к ампициллину, пиперациллину, гентамицину, тобрамицину, цiproфлоксацину, норфлоксацину, триметоприму и сульфаметоксазону. *Staphylococcus spp.* устойчив к ампициллину, бацитрацину, доксициклину, клиндомицину, линезолидому, рифампицину, эритромицину, цефазолину и цефамондону. *Streptococcus uberis* устойчив ампициллину, бацитрацину, доксициклину, клиндомицину, линезолидому, рифампицину, эритромицину, цефазолину, цефамондону. *Proteus mirabilis* устойчив к ампициллину, пиперациллину, гентамицину, тобрамицину, цiproфлоксацину, нитрофурантоину, триметоприму и сульфаметоксазону. *Aerococcus viridans* устойчив к эритромицину, тетрациклину, нитрофурантоину, триметоприму и сульфаметоксазону.

При исследовании патогенности выделенных культур установлено, что многие микроорганизмы (*Kocuria rosea*, *Myroides spp.*, *Aerococcus viridans*, *Alloiococcus otitis*, *Aerococcus viridansxylosus*, *Acinetobacter lwoffii*) не патогенны для белых мышей. Однако их присутствие в мочевыводящих путях свиноматок в период воспалительных процессов может указывать на их косвенное участие в этих процессах.

В хозяйствах, где у свиноматок на фоне относительного благополучия по инфекционным заболеваниям часто наблюдают цистит и поражения почек на убое, прослеживается тенденция к послеродовым нарушениям (снижение рождаемости, повторные охоты, повышение процента мертворожденных поросят). Свиноматки с мочой и выделениями из родовых путей рассеивают в окружающую среду огромное количество микроорганизмов, которые попадают в организм поросят и являются причиной желудочно-кишечных и респираторных заболеваний.

Таблица 2 – Микрофлора, выделяемая из патматериала от поросят

№ п/п	Технологическая группа свиней	К-во, гол.	Изолирована микрофлора
1	Поросята-отъемыши	11	<i>Aerococcus viridans</i> ; <i>Morganella spp.</i> ; <i>Staphylococcus spp.</i> ; <i>Streptococcus Pluramimolisun</i> ; <i>Streptococcus saguinis</i> ; <i>Streptococcus epidermidis</i> ; <i>Streptococcus suis</i> mun II; <i>E. coli</i> ; <i>E. coli</i> : K99, K88, A20; <i>Proteus mirabilis</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Bordetella bronchiseptica</i> ; <i>Salmonella cholerae suis</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i>
2	Группа доразивания	10	<i>Streptococcus suis</i> mun II; <i>Streptococcus spp.</i> ; <i>E. coli</i> : не мунупаемая; <i>E. coli</i> : F 41; <i>Proteus mirabilis</i> ; <i>Pasteurella multocida</i> mun D; <i>Enterococcus faecalis</i>

Сравнивая микрофлору, выделяемую из мочевыводящих путей свиноматок и патматериала от поросят, обращает на себя внимание их схожесть, то есть возбудители факторных инфекций от свиноматок могут быть переданы поросятам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1 Для эффективной борьбы с факторными инфекциями на свиноводческих комплексах необходимо периодически изучать микробный пейзаж с обязательным бактериологическим исследованием проб материала от маточного поголовья свиней и определением антибиотикочувствительности изолированных микроорганизмов.

2 Наряду с проведением вакцинации свиноматок в комплекс противоэпизоотических мероприятий с целью повышения их эффективности целесообразно регулярно перед осеменением включать химиопрофилактику с использованием антибиотиков широкого спектра действия и с учетом антибиотикочувствительности бактерий в каждом отдельно взятом хозяйстве.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Ананчиков, М.А. Особенности формирования эпизоотического процесса при факторных инфекциях. – *Сельское хозяйство – проблемы и перспективы* /Сб. научн. трудов, т.3, ч.3: ветеринарные науки. – Гродно, 2004 – с. 95–99.
- 2 Андросик, Н.Н., Бирман, Б.Я., Гутковский, А.А. Эффективность бактериального препарата на основе бацилл при лечении кишечных инфекций у молодняка сельскохозяйственных животных и птиц // *Мат. Межд. Науч.- практ. конф.*, Минск, 2000. – С. 239–241.
- 3 Малик, Е.В. Этиологическая структура стрептококкозов свиней: автореф. дисс. канд. вет. наук. – М. – 2000. – 25 с.
- 4 Плешакова, В.И., Колычев, Н.М., Каримова, Л.М., Липатов, П.П. Инфекции мочевыводящих путей свиней, обусловленные *Actinobaculum suis*: монография./ В.И. Плешаков [и др.] –Омск: Изд-во ОГМА, 2001. –128 с.
- 5 Поляк, М.С. Ошибки в антибиотикотерапии // *Антибиотики и химиотерапия*. – 1990. – Т. 35.–№ 8. – С. 48–51.
- 6 Романова, Л.Я. Этиология и профилактика факторных инфекций свиней. / Л.Я. Романова, И.А. Рубинский // *Ж. «Ветеринарный консультант»*. – № 13–14, 2005. – С. 10–12.
- 7 Рубинский, И.А. Сочетанное влияние иммунофана и метионина на организм животных. / И.А. Рубинский, Л.Я. Романова // *Учёные записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины*. – Казань. 2002. – С. 66–69.
- 8 Сазыкин, Ю.О. Фундаментальные основы антимикробной химиотерапии: некоторые новые данные // *Антибиотики и химиотерапия*. – 1990. – Т. 35.– № 9. – С. 4–11.
- 9 Туварджиев, А.В., Соколов, В.Д. Влияние аэрозолей гентамицина и ампицилина на уровень витаминов А и С в организме цыплят // *Ветеринария*. – 1984. – № 12. – С. 58–59.
- 10 Йоданова, А.И., Смолкина, Т.В., Никитина, А.В. Многофакторный анализ действия норфлоксацина на гуморальный иммунный ответ // *Антибиотики и химиотерапия*. – 1995. – Т. 40.– № 3. – С. 16–21.

УДК 619.616-093/-098.636.597.033

РИЕМЕРЕЛЛЕЗ ВОДОПЛАВАЮЩЕЙ ПТИЦЫ

Р.П. ЛИЗУН

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского»,
Минск, РБ

Поступила в редакцию 26.06.2015 г.

Риимереллез – острая или хроническая септицемия водоплавающей птицы, характеризующаяся фибринозным перикардитом, перигепатитом, аэросаккулитом и менингитом. Иногда инфекция органов дыхания проходит без выраженных клинических признаков. Заболевание также известно еще под названиями «новая болезнь уток» и «экссудативная септицемия гусей».

Риимереллезом болеют утята 1–8-недельного возраста, наиболее восприимчива птица в 3–5 недель. Распространение инфекции происходит, в основном, горизонтально аэрогенным или контактным путем (через слизистую оболочку конъюнктивы или микротравмы на подошвах конечностей), что подтверждает экспериментальное инфицирование подопытных утят аэрогенным и парэнтеральным способом; алиментарным способом воспроизвести инфекцию не удалось.

Возбудитель. *Riemerella anatipestifer* (RA) – типовой вид рода *Riemerella*, впервые был описан *Riemer* в 1904 г. как бактериальный патоген, вызывающий экссудативную септицемию у гусей. Микроорганизм длительно относили к разным родам; так, в разное время его рассматривали как *Moraxella anatipestifer*, *Pfeiferella anatipestifer*, *Pasteurella anatipestifer* пока окончательно в 1993 г. его не выделили в отдельный род *Riemerella*, сем. *Flavobacteriaceae* (к этому же семейству относится известный патоген кур и индеек *Ornithobacterium rhinotracheale*). Несколько лет *Riemerella anatipestifer* считалась единственным представителем рода, но постепенное накопление и изучение изолятов, полученных от птиц, позволило выделить в 1999 г. группу атипичных штаммов риимерелл в вид *Riemerella columbina*, выделенных от голубей с признаками респираторных заболеваний. Позже к роду добавился новый вид *Riemerella columbipharynx*, выделенный из гортани клинически здоровых голубей (не имеет клинического значения). Последние 2 вида регистрируются у голубей. Кроме домашней и дикой водоплавающей птицы и голубей *Riemerella anatipestifer* была выделена от больных септициемией цыплят, индеек, а также от больных бронхопневмонией поросят.

Отдельно следует отметить, что еще в 1998 г. внутри единственного тогда вида *Riemerella anatipestifer* была выделена группа штаммов, изолированных от больных риимереллезом уток и гусей, но отличающихся по своим биохимическим характеристикам от типовых представителей вида, в так называемый Таксон 1502. Генетический анализ Таксона 1502 объединил всех его представителей в отдельный род с единственным видом *Coenonia*

anatina. Данный микроорганизм вызывает такую же клиническую картину заболевания водоплавающей птицы, что и *Riemerella anatipestifer*. По данным немецких исследователей в 1994–1995 гг. *Coenonia anatina* была выделена у 30% павших с признаками септицемии коммерческих уток.

В связи с тем, что на данный момент такой нозологической единицы как «коэнониоз уток» до сих пор не возникло, возбудителями риермереллезной инфекции водоплавающей птицы можно считать 2 микроорганизма, вызывающие одинаковую клиническую картину – *Riemerella anatipestifer* и *Coenonia anatina*.

Riemerella anatipestifer – грамотрицательная, неподвижная, неспорообразующая палочка, в мазках располагается отдельно, парами или в виде отдельных цепочек, размеры 0,2–0,4х1–5 мкм. Микроорганизм не растет на обычных питательных средах, хорошо культивируется на кровяном или шоколадном агаре в атмосфере, обогащенной CO₂. Оптимум культивации – 48–72 часа при температуре +37°C в эксикаторе при повышенном содержании CO₂ (в пламени свечи или с использованием специальных газогенерирующих пакетов для микроаэрофилов). Через 48–72 часа на кровяном агаре формируются прозрачные или сероватые маслянистые колонии 1–2 мм в диаметре; некоторые штаммы в процессе роста продуцируют слизь.

Риермереллы не ферментируют углеводы, в связи с чем диагностика по биохимическим признакам затруднительна. РА оксидазо- и каталазоположительна; из основных признаков следует отметить разжижение желатина, отсутствие гемолиза, отсутствие продукции индола и сероводорода. На данный момент описано 20 серотипов риермерелл; перекрестная серозащита между серотипами слабая, что является препятствием к разработке стандартизированной вакцины против РА-инфекции. В мировой практике в случае ощутимых потерь вследствие риермереллеза используют аутовакцины – вакцины, изготовленные из штамма РА, циркулирующего в данном птицеводческом хозяйстве.

Риермереллы слабо устойчивы. Большинство штаммов на питательных средах не выживает дольше 3–4 дней при температуре +37°C или комнатной температуре, а также дольше 2–3 недель при температуре +4°C. Температура выше +55°C является губительной. В подстилке птицеводческих помещений РА может сохраняться до 30 дней. Генетическая устойчивость к канамицину, полимиксину, колистину и умеренная устойчивость к гентамицину позволяет добавлять эти антибиотики в питательную среду для подавления роста посторонней флоры при изоляции микроорганизма из патологического материала.

Клинические и патологоанатомические признаки. Основным признаком болезни – нервные расстройства различной степени тяжести и локализации: тремор и судорожные подергивания головы, шеи, крыльев; голова часто опущена, шея втянута в плечи. Наблюдается атаксия, птица теряет координацию и способность передвигаться. Одновременно с нервными явлениями наблюдается понос зеленоватого цвета и слизисто-гнильные выделения из глаз и носа. Птица впадает в кому и гибнет через 2–3 дня после появления клинических признаков в характерной позе – на спине, свернув-

пшись кольцом. Выжившая птица отстает в росте.

При вскрытии поражения напоминают коли-инфекцию: фибринозный перикардит, перигепатит, аэросаккулит; легкие при этом остаются не пораженными.

В лабораторию диагностики болезней птиц РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им.С.Н.Вышелесского» обратилось частное бройлерное птицеводство, занимающееся выращиванием пекинских уток. Завоз суточного молодняка осуществлялся от постоянного поставщика-репродуктора из одной из стран Европы. Полгода назад одновременно с основным поставщиком суточного молодняка была завезена небольшая партия утят новой породной линии из другой страны. Утят обеих партий посадили в один птичник, разделив их невысокой перегородкой. Через 5 дней совместного выращивания партию от нового поставщика перепродали за пределы страны. Через 3 недели у утят, оставшихся в том же птичнике, началось новое, не регистрируемое ранее заболевание, характеризующееся появлением в 27–34 дня судорог, тремора головы и шеи, наблюдалось отставание в росте, диарея от бело-желтого до зеленого цвета, изредка – с кровью. Птица сидела неподвижно с опущенной головой. Заболевание, в среднем, длилось 6–8 дней; заболеваемость регистрировалась невысокая – до 3,5% (регистрация по явным клиническим признакам с нервными симптомами), летальность при этом – до 50%. Утята погибали на спине или в скрученной позе. Попытки остановить инфекцию колистином, увеличением профилактических перерывов между посадками с одновременным ужесточением мер дезинфекции оказались безуспешными. Горизонтальным путем (через обслуживающий персонал) болезнь распространилась на остальные птичники хозяйства.

При осмотре доставленных больных утят наблюдали угнетение, атаксию, тремор головы и крыльев, шаткую походку. Утята лежат на животе, расставив крылья. Глаза прищурены, отмечается слезотечение. Водянистая диарея зеленоватого цвета.

При вскрытии у некоторых птиц не было отмечено видимых патологоанатомических изменений, кроме легкого помутнения воздухоносных мешков (аэросаккулит); у других наблюдали нежные фибриновые наложения на печени и сердце.

Бактериальную культуру, близкую к *Riemerella anatipestifer*, удалось выделить только из головного мозга больных утят на кровяном агаре (с 5% крови кур) при культивировании в микроаэрофильных условиях (в эксикаторе со свечой).

Первичный 24 ч рост на кровяном агаре – слизистые мелкие прозрачные колонии, при микроскопии – Грамотрицательные неподвижные тонкие нежные палочки. В дальнейшем 48–72 ч субкультуры на кровяном агаре – серые маслянистые выпуклые слизистые колонии, при микроскопии – грамотрицательные неподвижные тонкие, короткие и длинные палочки, иногда нитевидной формы.

Биохимические исследования были выполнены рутинными методами (таблица 1) при помощи дифференциально-диагностических сред и при помощи микробиоанализатора Vitek-2 (BioMerieux, Франция) (фото). Изолят

культивировался только на плотной среде с добавлением 5% крови кур в условиях повышенного содержания CO₂ (в эксикаторе со свечой), не рос на среде с лактозой (агар Клиглера) и в анаэробных условиях (среда Кит-Тароцци), не обладал гемолизом, желатиназной, уреазной и ферментативной активностью, не продуцировал сероводород и индол, не ассимилировал цитрат; каталаза-, фосфатаза-, липаза-положительный.

Таблица 1 – Биохимический профиль выделенного изолята (рутинные методы)

Признак	Условие	Результат
рост в МПБ	+ 37°C	—
рост в МПБ	+ 37°C, 10% сыворотки кур	—
рост в МПБ	+ 37°C, 10% сыворотки кур, CO ₂	—
рост на МПА	+ 37°C	(+) только первичный посев
рост на МПА	+ 37°C, 5% крови кур, CO ₂	(более выражен через 72 ч)
рост на среде с лактозой	Клиглера, CO ₂	—
рост в среде Кит-Тароцци	(анаэробные условия)	—
подвижность	висячая капля	—
гемолиз	МПА+5% крови кур	—
каталаза	внесение в H ₂ O ₂	+
желатиназа	+22°C (до 4 суток)	—
желатиназа	+37°C, CO ₂	—
индол	диагностические полоски	—

База Vitek-2 представила 2 варианта микроорганизмов, оба – в статусе низкой идентификации: *Chryseobacterium indologenes* и *Brevundimonas diminuta/vesicularis*. Оба варианта – внутрибольничные изоляты нозокомальных инфекций, не подходили по культуральным, биохимическим и мор-

фологическим признакам для идентификации выделенного нами штамма.

Штамм был чувствителен к ампициллину, цефалексину, линкоспектину, доксициклину, меропенему и триметоприму; устойчив к левофлоксацину, норфлоксацину, тетрациклину и колистину.

Хотя в биохимическом профиле штамма отмечались некоторые несоответствия (отрицательные желатиназа и уреаза, положительная липаза) с профилем эталонного штамма RA ATCC 11845, выделенная культура была идентифицирована как *Riemerella anatipestifer* – по совокупности морфологических, биохимических, культуральных свойств и характеру клинических проявлений заболевания. Позднее идентификацию штамма как *Riemerella anatipestifer* (99,9%) удалось подтвердить при помощи микробиоанализатора Vitek MS (технология MALDI-TOF).

Группа изолята: 1722-1

Биономер: 5042003100240020

Микроорганизм: Low Discrimination Organism

Подробная биохимическая информация																	
2	APPA	+	3	ADO	-	4	PyrA	+	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	+	13	dGLU	-	14	GGT	+	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAap	-
23	ProA	+	26	LIP	+	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	SKG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	+	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	+	61	IMLTa	-	62	ELUM	-	64	ILATa	-			

Фото – Биохимический профиль выделенного изолята (Vitek-2)

По результатам исследований для птицеводческого хозяйства была подобрана оптимальная лечебно-профилактическая схема обработки стад и даны соответствующие рекомендации по контролю над инфекцией.

Контроль инфекции. Заболевание можно контролировать, если обеспечить четкое выполнение базовых противоэпизоотических мероприятий: всю птицу, прибывающую от нового поставщика, выдерживать в 30-дневном карантине в отдельном птичнике. Не садить птицу разных возрастов и разных партий в одно помещение. Не допускать плотной посадки и стрессов птицы – риимереллез особенно ярко проявляется при этих условиях. Для предупреждения горизонтальной передачи инфекции закрепить обслуживающий персонал за каждым птичником, если это не представляется возможным – закрепить отдельный персонал за карантинируемым птичником с недопущением посещения остальных птицеводческих помещений.

Оборудовать входы в птичники дезинфекционными барьерами (дезковриками). Для лиц, по роду занятий имеющих доступ во все птицеводческие помещения (ветеринарное обслуживание, ремонтно-технические работы, охранная служба), иметь в каждом птичнике для работы дополнительный комплект сменной обуви и спецодежды; перед и после непосредственного контакта с птицей руки обрабатывать дезинфицирующими средствами. Соблюдать профилактические перерывы между посадками партий птицы с выполнением необходимых дезинфекционных мероприятий и удалением и обезвреживанием подстилочного материала.

При возникновении заболевания больную птицу забивают и утилизируют, всю остальную птицу стада лечат. Лечебно-профилактические схемы обработки птицы антимикробными препаратами подбирают после выделения возбудителя и определения чувствительности к нему лекарственных средств. Во время забоя партии птицы, где регистрировался риермереллез, руководствуются ветеринарно-санитарными правилами по экспертизе тушек как при колибактериозе: при наличии патологоанатомических изменений в мышцах и внутренних органах (истощение, перикардит, перигепатит, аэросаккулит) тушки с органами утилизируют. При наличии изменений только во внутренних органах тушки проваривают или направляют на изготовление консервов, а внутренние органы утилизируют.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Perez, C. Риермереллез уток/ С. Perez // *Животноводство России*, 2014. – № 11. – С.34–35.
- 2 *Coenonia anatina* / *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Vol.4: The Bacteroidetes* – P.198.
- 3 Hinz, K. H. Phenotypic characteristics of *Riemerella anatipestifer* and similar micro-organisms from various hosts/ K. H. Hinz, M. Ryll, B. Kohler, G. Glunder, // *Avian Pathology*, Vol.27.– 1998. – P.33–42.
- 4 Li, J.X. *Riemerella anatipestifer* infection in chickens/J.X. Li, Y. Tang, J.Y. Gao, C.H. Huang, M.J. Ding // *Pakistan Veterinary Journal*, Vol.31(1).–2010. – P.65–69.
- 5 Rubbenstroth, D. *Investigations on the taxonomy of the genus Riemerella and diagnosis of Riemerella infections in domestic poultry and pigeons* / D. Rubbenstroth// *Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree Doctor of Veterinary Medicine*. – Hannover, 2012. – 64 p.
- 6 Vandamme, P. *Capnophilic Bird Pathogens in the Family Flavobacteriaceae: Riemerella, Ornithobacterium and Coenonia* / P. Vandamme, H.M. Hafez, K. H. Hinz // *The Prokaryotes*. – Vol.7. – 2006 – P. 695–708.
- 7 Vandamme, P., Vancanneyt, M., Segers, P. *Coenonia anatina* gen. nov., sp.nov., a novel bacterium associated with respiratory disease in ducks and geese/ P. Vandamme, M. Vancanneyt, P. Segers [et al.]// *International Journal of Systematic Bacteriology*.– Vol.49.– 1999. – P.867–874.

УДК: 619:616.98-036.22:578.826.1:636.5(477)

ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ СИНДРОМА СНИЖЕНИЯ ЯЙЦЕНОСКОСТИ НА ПТИЦЕФАБРИКАХ УКРАИНЫ В ПЕРИОД 2010–2014 ГОДОВ

С. В. ТКАЧЕНКО

*Национальный научный центр «Институт экспериментальной
и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков, Украина*

Поступила в редакцию 04.08.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Синдром снижения яйценоскости (*egg drop syndrome*) – вирусное заболевание кур-несушек, которое характеризуется внезапным снижением яичной продуктивности и кладкой яиц с депигментированной, тонкой и хрупкой скорлупой или вообще без скорлупы.

Этиологическим агентом заболевания является вирус, который относят к семейству *Adenoviridae* роду *Atadenovirus*. Возбудитель вызывает патологии органов дыхательной системы у гусей и пекинских уток [1, 2]. Одной из особенностей вируса является его способность к агглютинации. Только два из известных в наше время аденовирусов птиц, а именно CELO (FAV 1) и ССЯ, способны агглютинировать эритроциты. Но, в отличие от вируса CELO, который агглютинирует только эритроциты мышей, вирус ССЯ агглютинирует эритроциты многих видов птиц [3, 4, 5].

В настоящее время с целью диагностики синдрома снижения яйценоскости используют преимущественно серологические методы (реакция задержки гемагглютинации, иммуноферментный анализ, реакция иммунофлуоресценции, реакция нейтрализации), а также выделение вируса из патологического материала на развивающихся утиных эмбрионах. Кроме того, используют метод сравнительного рестрикционного анализа генома аденовируса, который требует выделения геномной ДНК в большом количестве [6, 7].

Поэтому целью наших исследований было проведение эпизоотического мониторинга касательно указанного возбудителя вирусного заболевания кур на территории разных областей Украины в период с 2010 по 2014 годы с использованием метода РЗГА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

От кур-несушек разных возрастных групп отбирали кровь, которую использовали для получения сыворотки. Исследования проводили в следующих областях: Винницкая – 1 частное хозяйство; Донецкая – 2 промышленные птицефабрики и 1 частное хозяйство; Днепропетровская – 1 птицефабрика; Ивано-Франковская и Харьковская – по 3 птицефабрики; Луганская – 2 промышленные птицефабрики; Николаевская и Хмельницкая – по 1 промышленной птицефабрике.

В работе использовали вирус ССЯ (штаммы «L-497» та «Crimea'07»),

полученный на 10–11-суточных развивающихся утиных эмбрионах путем инфицирования в алантоисную полость в дозе 0,2 см³. Гибель эмбрионов в первые 24 часа после инфицирования считали неспецифической. Инактивацию инфекционных свойств вируса проводили формалином по стандартной методике.

Положительную сыворотку получали путем гипериммунизации кроликов породы Шиншила, живым весом 2–2,5 кг, которым вводили инактивированную вакцину против ССЯ со штамма ВС-14 (фирма «Intervet International B.V.» Голландия) по экспериментально отработанной схеме. Постановку РЗГА проводили согласно методикам Международного эпизоотологического бюро.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В настоящее время большое внимание в гуманной и ветеринарной медицине уделяется заболеваниям аденовирусной этиологии. В птицеводстве аденовирусные инфекции не считаются опасными, но являются экономично значимыми.

Благодаря анализу результатов диагностических исследований отдела изучения болезней птиц ННЦ «ИЭКВМ» за 2010–2014 годы и непосредственно эпизоотологическое обследование птицеводческих хозяйств 8 областей Украины, установлено наличие антител вируса ССЯ (рисунок 1). Для исследований отбирали сыворотку крови от кур-несушек 107–580-дневного возраста.

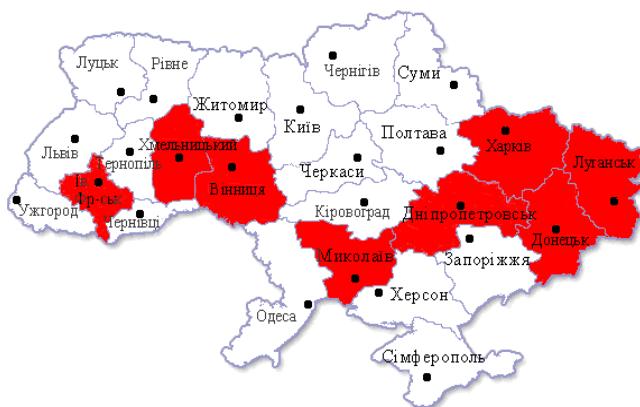


**Рисунок 1 –
Регионы Украины,
на территории
которых
проводился
серологический
мониторинг**

На рисунках 2–6 представлены данные о количестве исследуемых проб за каждый год и их распределение на титрогруппы.

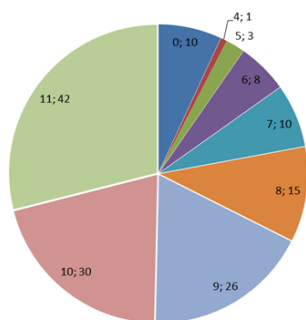


Рисунок 2 – Титрогруппы ($\log_2$) и количество исследованных проб в 2010 году, которые относятся к соответствующим титрогруппам

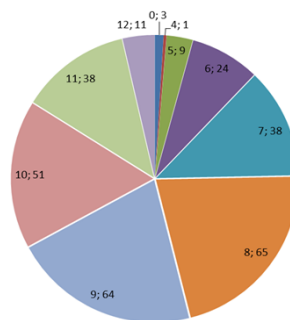


Рисунок 3 – Титрогруппы ($\log_2$) и количество исследованных проб в 2011 году, которые относятся к соответствующим титрогруппам

В результате исследований сывороток крови кур-несушек (304 пробы) установлено, что в 2010 году средний титр антител к вирусу ССЯ был $8,64 \pm 2,87 \log_2$.

В результате исследований сывороток крови кур-несушек (303 пробы) установлено, что в 2011 году средний титр антител к вирусу ССЯ был $8,59 \pm 1,89 \log_2$.

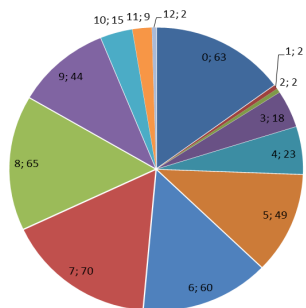


Рисунок 4 – Титрогруппы ($\log_2$) и количество исследованных проб в 2012 году, которые относятся к соответствующим титрогруппам

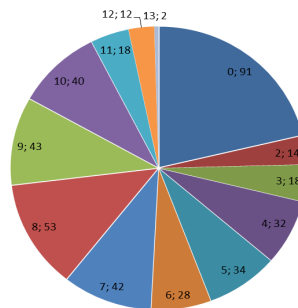


Рисунок 5 – Титрогруппы ($\log_2$) и количество исследованных проб в 2013 году, которые относятся к соответствующим титрогруппам

В результате исследований сывороток крови кур-несушек (422 пробы) в 2012 году средний титр антител к вирусу ССЯ был $5,77 \pm 3,01 \log_2$.

В результате исследований сывороток крови кур-несушек (422 пробы) в 2013 году средний титр антител к вирусу ССЯ был $5,65 \pm 3,75 \log_2$.

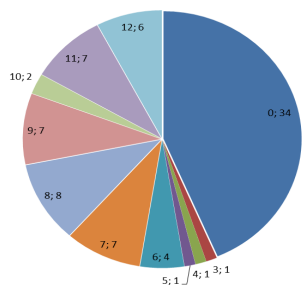


Рисунок 6 – Титрогрупи (log₂) и количество проанализированных проб в 2014 году, которые относятся к соответствующим титрогруппам

В результате исследований сывороток крови кур-несушек (422 пробы) в 2014 году средний титр антител к вирусу ССЯ был $4,79 \pm 4,6 \log_2$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, за период с 2010 по 2014 гг. установлено наличие группового иммунитета к вирусу синдрома снижения яйценоскости на птицефабриках 8 областей Украины. Также выявлено от 34 до 91 пробы сывороток крови без антител к исследуемому вирусу, что связано с возрастом птицы (от 107 до 152 суточного возраста), когда профилактическая вакцинация еще не проводилась или с момента такой вакцинации прошло не более 10 дней и наработка антител в организме птиц еще не произошла.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о стойком благополучии птицеводческих хозяйств относительно синдрома снижения яйценоскости на территории Украины.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Cha, S.Y. Epidemiology of egg drop syndrome virus in ducks from South Korea [Text] / S.Y. Cha, M. Kang, C.K. Park, K.S. Choi, H.K. Jang // *Poult. Sci.* – 2013. – V. 92–(7). – P.1783–1789.
- 2 Cha, S.Y. Respiratory disease due to current egg drop syndrome virus in Pekin ducks [Text] / S.Y. Cha, M. Kang, O.K. Moon, C.K. Park, H.K. Jang // *Vet. Microbiol.* – 2013. – V. 165. – P. 305–311.
- 3 Adair, B.M. Biological and physical properties of a virus (strain 127) associated with the egg drop syndrome 1976 [Text] / B.M. Adair, J.B. McFerran, T.J. Connor // *Avian Pathol.* – 1979. – V.8. – P.249–264.
- 4 Lu, Y.S. Outbreaks of egg drop syndrome-1976 in Taiwan and isolation of the etiological agent [Text] / Y.S.J. Chin. *Soc. Vet. Sci.* – 1985. – V.11. – P.157–165.
- 5 Ткаченко, С.В. Рецепторна специфічність еритроцитів різних видів тварин до деяких аденовірусів [Текст] / С.В. Ткаченко // *Вет. медицина : між від. темат. наук. зб.* – X., 2009. – Вип.92. – С.484–486.
- 6 Zsak, L. Studies of egg drop syndrome (EDS) and chick embryo lethal orphan (CELO) avian adenovirus DNA by restriction endonucleases [Text] / L. Zsak, J. Kisary // *J. gen. Virol.* – 1981. – V.56. – P.87–95.
- 7 Pallister, J.A. Comparison by restriction enzyme analysis of three fowl adenoviruses of varying pathogenicity [Text] / J.A. Pallister, M. Sheppard // *Vet. Microbiol.* – 1995. – 48. – P.155–163.

УДК 619:638.154.4-084

ИЗУЧЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ПРОЯВЛЕНИЯ МИКОЗНЫХ ПАТОЛОГИЙ У ПЧЕЛ

М.И. ЧЕРНИК

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского»,
г. Минск, РБ*

Поступила в редакцию 02.07.2015 г.

В современных условиях интенсификации сельскохозяйственного производства пчеловодство приобретает большое значение в повышении урожайности плодово-ягодных, овощных, кормовых, технических и других сельскохозяйственных культур. Пчеловодство, как отрасль сельского хозяйства, отличается от других средствами производства, технологией, организацией и конечным продуктом. Оно имеет ряд особенностей, которые влияют на ее организацию и специализацию. Пчелы производят специфические продукты: мед, воск, пыльцу, маточное молочко, прополис, яд, которые используются в промышленности, медицине, кондитерском производстве, косметике, фармацевтике и в повседневной жизни человека.

Однако в последнее время серьезным препятствием в развитии пчеловодства являются инфекционные и инвазионные болезни пчел – варроатоз, нозематоз, гнильцы, вирозы и микозы. Среди последних наибольшее распространение имеет аскосфероз, обуславливающий ослабление пчелосемей, снижение способности пчел к медосбору и опылению, иногда гибель пчел. Заболевания наносят существенный экономический ущерб отрасли.

В Республике Беларусь комплексные исследования по эпизоотологии, патогенезу, клиническим и патоморфологическим изменениям при аскосферозе пчел и разработке эффективных мер профилактики и лечения заболевания не проводились, поэтому работа в данном направлении имеет научно-практическую значимость.

Новизна работы заключается в изучении эпизоотической ситуации по микозам пчел для разработки ветеринарно-санитарных мероприятий по оздоровлению пчелопасек от основных микозных болезней пчел.

Цель работы – изучение закономерностей проявления микозных патологий у пчел и изучение эпизоотической ситуации по основным микозам пчел.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась в 2010–2012 гг. в лаборатории болезней рыб и пчел отдела болезней птиц, на экспериментальной пасеке института, в пчеловодческих хозяйствах и частных пасеках Минской и Брестской областей, а также на пасеке РУП «Институт плодородия НАН Беларуси».

Эпизоотическую ситуацию изучали по разработанной нами схеме обследования пчеловодческих хозяйств, а также в соответствии с «Методическими указаниями по отбору патологического материала, крови,

кормов и пересылки их для лабораторного исследования», (утверждены ГУВ МСХ и П РБ 16.01.2008, № 10-1-5/36). Для выявления больных пчелиных семей обращали внимание на поведение пчел, состояние предульевых площадок, сотов, расплода и кормовых запасов. При исследовании предульевых площадок обнаруживали больных и мертвых пчел, трутней, выброшенный расплод. При наличии ползающих пчел исследовали у них состояние кишечника, извлекая его пинцетом. Для осмотра гемолимфы разрезали и сдавливали грудь. Обращали внимание на состояние выброшенного расплода.

При клиническом обследовании больных пчелосемей определяли степень поражения расплода с учетом погибших личинок в соторамках и выброшенных на дно улья. При слабой степени поражения обнаруживали до 10, при средней – от 11 до 100, при сильной – более 100 погибших личинок.

Отбор материала для исследования проводили согласно «Методическим указаниям по отбору патологического материала, крови, кормов и пересылки их для лабораторного исследования» (утверждены ГУВ МСХ и П РБ 16.01.2008, № 10-1-5/36).

Микроскопические исследования проводили согласно «Методическим рекомендациям по проведению микроскопических исследований в ветеринарных диагностических лабораториях» (утверждены ГУВ МСХ и П РБ 03.03.2008, № 10-1-5/137).

Микологические исследования осуществляли в соответствии с «Методическими рекомендациями по изучению и разработке способов профилактики и борьбы с аскоферозом пчел, по приготовлению препаратов пчел и других насекомых для микроскопии» (Москва, 1987г.).

При изучении влияния экспериментального препарата на организм пчел использовали «Методические рекомендации по изучению морфологических и тинкториальных свойств бактерий» (утверждены ГУВ МСХ и П РБ 03.03.2008, № 10-1-5/133); «Методические рекомендации по определению количества микробных клеток в исследуемом материале» (утверждены ГУВ МСХ и П РБ 03.03.2008, № 10-1-5/132); «Методические указания по определению чувствительности к антибиотикам возбудителей инфекционных болезней сельскохозяйственных животных» (утверждены ГУВ МСХ и П РБ 17.12.2007, № 10-2-5/1112).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

По литературным данным основными микозными заболеваниями пчел являются аскофероз, аспергиллез, кандидамикоз.

Всего нами обследовано 13 пчелопасек Минской и Брестской облас-

тей. Результаты исследований представлены в таблицах 1, 2, 3.

Примечание – + диагноз установлен; ± сомнительный диагноз; – отрицательный диагноз.

Как показали результаты проведенных исследований, на пчелопасеках республики основным микозным заболеванием является аскофероз. Сомнительные диагнозы на аспергиллез и кандидамикоз лабораторными исследованиями подтверждены не были.

Клинические признаки заболевания зависели от формы проявления

болезни. Различали скрытую, легкую и тяжелую формы течения аскофероза.

Таблица 1 – Результаты лабораторного исследования патологического материала, отобранного на пасеках Червенского района Минской области

Название хозяйства	№ пробы	Результаты исследований		
		аскофероз	аспергиллез	кандидамикоз
«Колледж»	№1	+	±	-
	№2	-	-	-
«Запольский»	№1	-	-	±
	№2	-	±	-
	№3	+	-	-
«Строй Агро»	№1	-	-	±
	№2	+	±	-
«Новые зеленки»	№1	±	-	-
	№2	-	-	-

за.

Таблица 2 – Результаты лабораторного исследования патологического материала, отобранного на пасеках Минского района

Название хозяйства	№ пробы	Результаты исследований		
		аскофероз	аспергиллез	кандидамикоз
«1-я Минская птицефабрика»	№1	-	±	-
«Минская овощная фабрика»	№1	+	-	-
	№2	±	±	-
	№3	-	-	±
«Луговая слобода»	№1	±	-	±
	№2	+	-	-
	№3	-	±	-

При скрытой форме течения болезни отмечались единичные пораженные личинки, при этом клинических признаков заболевания обнаружить не удавалось.

При легкой форме поражения аскоферозом (до 10 пораженных личинок на соте) удавалось обнаружить пораженные личинки. По мере повышения температуры окружающей среды и улучшения кормовой базы летная активность пчел повышалась, что могло способствовать самовыздоровлению. Однако легкая форма проявления болезни могла перейти в тяжелую форму (до 100 пораженных личинок на соте).

Таблица 3 – Результаты лабораторного исследования патологического материала, отобранного на пасеках Барановичского района Брестской области

Название хозяйства	№ пробы	Результаты исследований		
		аскосфероз	аспергиллез	кандидамикоз
«Мир»	№3	+	-	-
	№4	+	±	-
	№5	+	-	-
«Полонечка»	№2	-	±	-
	№8	±	-	-
«Вольно-Чернихово»	№11	-	±	-
	№20	-	-	±
	№42	+	-	-
«Барановичский пчелопитомник» пчелопасека №1	№52	±	±	-
	№55	+	-	±
	№190	±	-	-
«Барановичский пчелопитомник» пчелопасека №2	№10	+	±	-
	№11	±	-	-
	№57	+	-	±
«Барановичский пчелопитомник» пчелопасека №4	№1	-	-	-
	№4	+	±	-
	№5	-	±	-

В пораженных семьях пчелы не в состоянии были очистить ячейки от мумифицированных личинок, матки прекращали яйцекладку, что приводило к уменьшению количества пчел, ослаблению семьи, а также к гибели семьи.

Различали три стадии проявления клинических признаков. *Первая стадия* – заражение и гибель расплода. Наблюдалось вытягивание личинок вдоль стенок ячейки, поверхность кутикулы тускнела, происходило сглаживание сегментации личинок. Личинки приобретали плотную консистенцию, ячейки не запечатывались. *Вторая стадия* – рост мицелия. Отмечали рост мицелия на поверхности тела личинки. Происходил переход аскоспор в цистах в гифальную фазу. Деструктивные изменения в органах и тканях личинки были вызваны прорастанием мицелия гриба в жировую ткань. Личинки покрывались белым грибным мицелием, который заполнял свободное пространство ячеек. *Третья стадия* – мумификация расплода. Наблюдали обызвествление тела личинки. Мицелий толстым слоем покрывал нижнюю часть личинок, слабее — спереди, и оставалась свободной от него подсохшая головная часть. Мумии личинок, объем которых уменьшился, становились твердыми. Вследствие разнополости гриба различали две картины заболевания. Если в ячейке имелся один из полов с проросшим мицелием, то плодовые тела не образовывались и цвет личинки оставался белым или желто-белым. В случаях попадания в ячейку женского и мужского мицелия

на поверхности и внутри личинки образовывались цисты, которые придавали мертвой личинке, обычно погибающей в стадии предкуколки, грязно-коричневый цвет.

Инфицированные личинки размещались беспорядочно между заболевшим расплодом и создавали впечатление здоровых. Больные предкуполки лежали мумифицированными в открытых, распечатанных пчелами ячейках или еще не запечатанных, крышечки которых в большинстве нормальные, однако иногда пятнистые или несколько проваленные. У мумифицированных особей коконы были почти готовы и, поскольку не прикреплены к доньшкам и стенкам, могли быть легко извлечены из ячеек пинцетом. В запечатанных ячейках мумии, если сот потрясти, издавал характерный «брякающий» звук и выпадали из ячеек при удалении с них крышечек. На стационарно-неблагополучных пасеках расплод мог поражаться до 60–70 %. На дне улья, на предлетковой площадке, за разделительной доской скапливалось большое количество выброшенных пчелами мумифицированных личинок (рисунки 1, 2).



Рисунок 1 – Выброшенные за разделительную доску личинки, пораженные *Ascospaera apis*



Рисунок 2 – Личинки, пораженные *Ascospaera apis*, на дне улья

При диагностике заболевания мы учитывали эпизоотологические данные, клинические и патоморфологические изменения.

При клиническом обследовании больных пчелосемей определяли степень поражения расплода с учетом погибших личинок в соторамах и выброшенных на дно улья. При слабой степени поражения обнаруживали до 10, при средней – от 11 до 100; при сильной – более 100 погибших личинок.

Таблица 4 – Характеристика пчелосемей, пораженных аскосферозом

№ п/п	Количество рамок, шт	Количество корма, кг	Количество расплода, тыс. печатных ячеек	Количество пораженных личинок на сотах, шт	Степень поражения
1	15	10	33,4	127	сильная
2	14	5	40,4	43	средняя
3	13	7	38,2	195	сильная
4	11	7,5	29,5	22	средняя
5	10	9,5	31,2	10	слабая
6	8	8,7	18,9	3	слабая
7	9	4	15,8	5	слабая
8	11	7	35,5	15	средняя
9	7	4,2	18,5	84	средняя
10	16	10,3	46,2	4	слабая
11	13	12	34,6	15	средняя
12	6	3,8	20,1	68	средняя

Всего доставлено в лабораторию и исследовано 100 проб патологического материала пчел, отобранных на пасеках Брестской и Минской областей.

Из доставленных проб в 36,4% подтвержден диагноз на аскосфероз, из них с сильной степенью поражения – 16,6%, средней – 50,0%, слабой – 33,3%.

Для исследования от подозрительных по заболеванию ульев были отобраны кусочки сотов с хаотично разбросанными ячейками, с погибшими и здоровыми личинками и куколками, а также с пергой, покрытой белым налетом. Больные личинки в распечатанных пчелами ячейках имели вид кусочка мела, в закрытых ячейках – при встряхивании сот издавали характерный «барабанный» звук.

Исследование мумифицированных личинок. Пораженные личинки были мумифицированы, легко извлекались из сот и имели вид кусочков извести или мела. Мумии с трудом можно было перерезать, поверхность же излома однородна. Имелись личинки, пораженные мицелием мужского пола желтовато-белого цвета и женского пола – белого цвета, а также пораженные обоими полами – грязно-серого цвета.

Перга в ячейках напоминала мумифицированный расплод, однако была мягкой, легко резалась, а поверхность среза имела концентрическое строение.



Рисунок 3 – Пораженные
сотовые ячейки с пергой

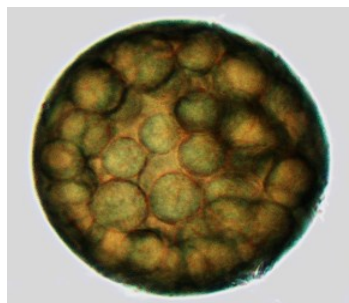


Рисунок 4 – Циста (плодовое
тело) гриба *Ascospaera apis*
(увеличение $\times 400$)

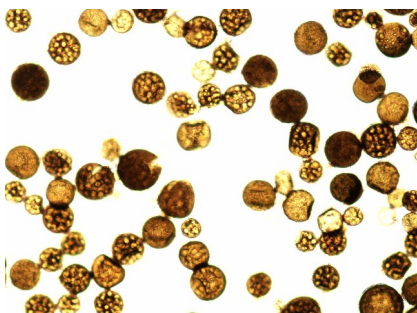


Рисунок 5 – Цисты *Ascospaera apis*,
заполненные спорными шарами
(увеличение $\times 100$)



Рисунок 6 – Выросшие
колонии на среде Сабуро

Для культивирования возбудителя аскосфероза пчел в лабораторных условиях использовали агар Сабуро и агар Чапека. Перед посевом в разогретый до жидкого состояния агар ($45-50^{\circ}\text{C}$) добавляли стрептомицин 100 ЕД на 1 мл среды для подавления роста сопутствующей бактериальной микрофлоры. Пораженные личинки извлекали из ячеек сотов, помещали в стерильную пробирку, измельчали с помощью препаровальной иглы. Затем частицы размером не более 1 мм помещали при помощи микологической иглы в чашки Петри с одной из указанных питательных сред в 3 точки (по одной частице). Культивирование проводили в термостате при температуре $28-32^{\circ}\text{C}$. За ростом культуры наблюдали в течение 5–10 дней. Рост на среде Сабуро отмечался на 3 сутки, на Чапека – 5 сутки. При этом на поверхности среды появлялись белые и серовато-белые пушистые колонии.

При микроскопии мицелия, выращенного на питательных средах, обнаружили многоклеточный септированный мицелий с многоядерными клетками, ветвистые гифы, спорные цисты со спорными шарами, заполненными мелкими гладкими эллиптическими спорами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1 В результате проведенных исследований установлено, что основным микозным заболеванием пчел в Республике Беларусь является аскосфероз. Выделенные штаммы возбудителя аскосфероза пчел *Ascosphaera apis* относятся к классу *Ascomycetes* (сумчатые), подклассу *Protoascomycetes* (голосумчатые), семейству *Ascosphaeraceae*, роду *Ascosphaera*, виду *Ascosphaera apis* var. *apis*

2 Эпизоотическая ситуация по аскосферозу в Брестской и Минской областях остается напряженной. Отмечается сильная степень поражения пчелосемей. Количество больных семей на отдельных пасеках достигает 30%, что обуславливает ослабление пчелосемей, снижение способности пчел к медосбору и опылению, не позволяет эффективно использовать потенциал пчелосемей, приводит к гибели пчел и наносит существенный экономический ущерб отрасли.

3 Установлено, что болезнь чаще всего поражает слабые пчелиные семьи, обычно после длительных похолоданий при размещении пчелиных семей в сырых низинных местах. Кроме того, в интенсивности распространения аскосфероза немаловажное значение имеет нарушение равновесия микрофлоры и pH среды в пчелиной семье. Применение антибиотиков и интенсивное использование органических кислот для борьбы с варроатозом способствуют развитию аскосфероза.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Основа высокой продуктивности пчелиных семей [Текст] / М. И. Черник // Белорусское сельское хозяйство : ежемесячный научно-практический журнал. – 2010. – № 9. – С. 78–80.
- 2 Методические рекомендации по проведению ветеринарно-санитарных мероприятий на пчелопасеках при аскосферозе пчел / М. И. Черник [и др.]; рец.: А. А. Богуш, И. В. Насонов ; Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, Департамент ветеринарного и продовольственного надзора. – Минск, 2012. – 24 с.
- 3 Эпизоотическая ситуация по аскосферозу пчел / М. И. Черник // Современные технологии сельскохозяйственного производства : материалы XV Международной научно-практической конференции (Гродно, 18 мая 2012 года) / Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, Учреждение образования "Гродненский государственный аграрный университет". – Гродно, 2012. – Ч. 1: Агрономия. Защита растений. Зоотехния. Ветеринария. – С. 451–453.
- 4 Аскосфероз пчел / М. Черник // Хозяин : ежемесячный производственно-практический журнал. – 2013. – № 10. – С. 40–41 : фот. – Начало. Окончание в № 11, 2013 г. С. 38.
- 5 Куликов, Ю.Н. Щелочная среда в жизни пчел // Пчеловодство. – 2005. – № 7. – С. 31–32.
- 6 Клочко, Р.Т. Лечение пчел от разных заболеваний / Р.Т. Клочко, С.Н. Луганский // Пчеловодство. – 2006. – № 1. – С. 31–34.
- 7 Штейнхауз, Э. Патология насекомых. – М.: 1953.
- 8 Мерицев, В.М. Сезонная динамика аскосфероза, нозематоза и варроатоза пчел. Инновации в пчеловодстве/Науч.-исслед. ин-т пчеловодства. – Рыбное, 2009. – С. 230–235.

Раздел 3. ИММУНОБИОЛОГИЯ

УДК 576.5

ВЛИЯНИЕ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КОРОВ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Д.М. РИХМАЕР¹, А.В. ХОВАНКИНА¹, Ю.В. ПОТИРИДИ¹,
Л.М. МЕЖЕВИКИНА^{1,2}, Г.Ю. КОСОВСКИЙ¹

¹ФГБНУ «Институт биофизики клетки Российской академии наук»,
г. Пущино, РФ

²ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии и
репродуктивных биотехнологий», г. Москва, РФ

Поступила в редакцию 07.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Мезенхимные стволовые клетки костного мозга крупного рогатого скота (МСК КМ КРС) с повышенной чувствительностью к факторам пролиферации и дифференцировки являются перспективными моделями для изучения молекулярных механизмов, создания современных клеточных технологий для животноводства. Перспективы использования МСК КМ КРС чрезвычайно велики в плане решения вопросов селекции и улучшения пород сельскохозяйственных животных, а также непосредственного использования таких культур в качестве биореакторов биологически активных рекомбинантных белков и ферментов для сельского хозяйства и медицины. Другое, не менее важное направление в исследованиях на МСК КРС, – создание и отбор генетически стабильных клеточных клонов для моделирования гистотипической архитектоники ткани, получения в большом количестве дифференцированных клеток одного типа *in vitro*.

Для этого, как правило, используют многофункциональные молекулы ростовых факторов и цитокинов, регулирующих процессы клеточной пролиферации и дифференцировки. Такие молекулы перспективны в плане использования для выделения и культивирования первичных МСК КМ КРС с целью получения стабильных клонов и создания банка стволовых клеток сельскохозяйственных животных для биотехнологических исследований и развития клеточных технологий в животноводстве.

Целью настоящей работы было исследование механизмов действия на первичные культуры МСК КМ КРС фактора роста фибробластов (FGF), лейкемия ингибирующего фактора (LIF) и интерлейкина-2 (IL-2). Все три фактора обладают широким спектром действия на процессы клеточной пролиферации и дифференцировки, обнаруживают перекрестные эффекты в зависимости от типа и морфофункционального состояния клеток, на поверхности которых есть соответствующие рецепторные белки, посредством которых осуществляется передача сигнала в ядро. Все три фактора действуют на клетки-мишени по типу пара- и/или аутокринного регулятора [7, 8].

Пока мало еще известно, какую конкретную функцию выполняет каждый из этих факторов при действии на МСК КМ КРС. Следует также отметить, что данные литературы по влиянию этих факторов в системах *in vivo* и *in vitro* неоднозначны и крайне противоречивы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты. Исследования проводили на первичных культурах МСК КМ КРС. Клетки выдели из костного мозга взрослых животных по методу Косовского Г.Ю. [2]. Для устранения контаминации первичных культур в среду ДМЕМ добавляли 10-кратное количество антибиотиков-антимикотиков (Sigma, США). Клеточную суспензию предварительно фильтровали через стерильные нейлоновые фильтры с диаметром пор 100 мкм, насливали на фиколл (1.077) в соотношении 1:1, центрифугировали при 1500 об./мин в течение 20 мин до образования на границе раздела фаз белесоватого кольца, представленного моноклеарными клетками КМ – лейкоцитами и МСК. Эту суспензию промывали от фиколла путем кратковременного (5 мин) центрифугирования при 1500 об./мин в растворе Вер- сен-ЭДТА (ПанЭко, Россия). К осадку добавляли ростовую среду ДМЕМ с глутамином, 10% фетальной сыворотки коров (HyClone, США) и 100-кратно разбавленным раствором антибиотиков-антимикотиков (Sigma, США).

Культивирование МСК. Культивирование МСК КМ КРС проводили во флаконах, чашках Петри и 4-хлуночных эмбриологических планшетах в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37°C по стандартной методике [3]. Длительность культивирования первичных МСК составляла от 1–2 до 5–6 недель. По достижении монослоя культуры пассировали и/или замораживали для хранения при низких температурах -70 и -196°C. В качестве протектора использовали 10% раствор диметилсульфоксида (ДМСО, Sigma, США). Смену среды производили по мере закисления, как правило, на 2–3 сутки культивирования.

Оценка МСК в системе *in vitro*. Для оценки характера изменения морфофункционального состояния первичных культур МСК КМ КРС использовали инвертированные микроскопы (Nikon, Япония), автоматическую биостанцию (Nikon, BioStation IMq, Япония) с программным обеспечением режимов и параметров культивирования клеток теплокровных, прибор с программным обеспечением (SH800 Sony Biotechnology, Япония) для сортировки стволовых клеток, выявления в популяции доли живых клеток с помощью красителя пропидиума йодида.

При этом обращали внимание на скорость и характер роста МСК КМ в виде монослоя и/или отдельных колоний. В экспериментах по выявлению биологических эффектов ростовых факторов и цитокинов использовали первичные культуры МСК КМ КРС на 10–15 пассажах.

Регуляторные факторы. Использовали коммерческие рекомбинантные белки: фактор роста фибробластов (FGF - Fibroblast Growing Factor, Sigma, США), LIF - Leukemia Inhibitory Factor (PeproTech.inc., Канада), IL-2 (Interleukin-2, Sigma, США). Регуляторные факторы добавляли в культуральную среду α -МЕМ с 10% фетальной сыворотки в концентрации 10 нг/мл. Длительность культивирования МСК с регуляторными факторами зави-

села от состояния клеток, их способности к митотическим делениям и дифференцировке.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью вычисления средних арифметических значений и среднего квадратичного отклонения, используя компьютерные программы Sigma Plot и Microsoft Office Excel. Для оценки статистической значимости различий в группах сравнения использовали критерий соответствия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Культивирование МСК КМ КРС в присутствии экзогенного рекомбинантного белка со свойствами цитокина LIF показало, что в течение 24 ч эти клетки приобретают распластную квадратно-ромбовидную форму с достаточно узкими и относительно длинными отростками или без таких отростков (рисунок 1, LIF). Морфология МСК КМ КРС при культивировании в среде альфа-МЕМ с 10% фетальной сыворотки коров без добавления в среду LIF соответствовала стволовым клеткам (вытянутая треугольная и/или веретенообразная форма с большим количеством отростков (рисунок 1, контроль). В источниках литературы такие клетки называют арборизованными клетками, что характерно для первичных клонов МСК с высоким потенциалом к дифференцировке *in vitro*.

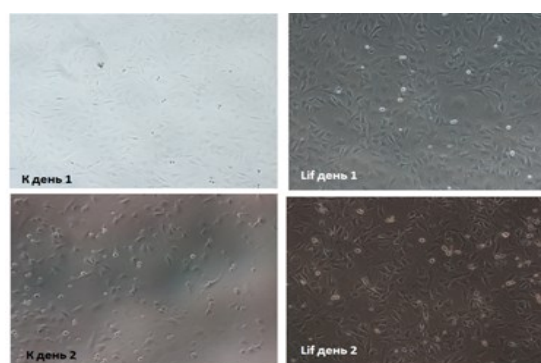


Рисунок 1 – Морфология монослоя МСК КМ КРС при стандартных условиях культивирования в среде α -МЕМ с 10% фетальной сыворотки коров (К – контроль) и при добавлении в среду 10 нг/мл рекомбинантного белка LIF (LIF – опыт); увеличение объектива 10х

В питательной среде с LIF формируется в течение первых суток культивирования (18 ч) достаточно плотный монослой, что было также характерным и для фактора FGF (рисунок 2). На рисунке 2 видны признаки эпителизации монослоя в присутствии LIF и FGF (верхний справа и нижний слева). При действии IL-2 в той же концентрации морфология монослоя сохранялась в пределах нормы и не отличалась от контроля. При увеличении продолжительности культивирования до 96 ч общая картина характера роста МСК КМ КРС оставалась прежней.

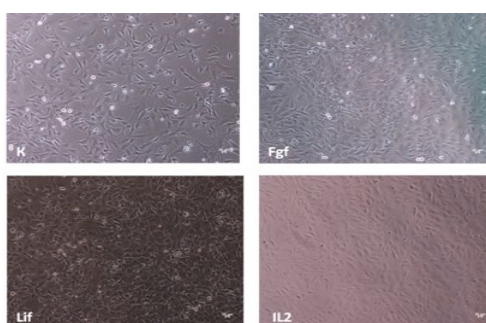


**Рисунок 2 –
МСК КМ КРС**

**Морфология
через 18 ч ин-**

**кубирования
в среде альфа-МЕМ с добавлением факторов FGF, LIF и IL-2
в концентрации 10 нг/мл; увеличение объектива 10х**

Оценка жизнеспособности МСК КМ КРС с помощью красителя пропидиума йодида выявила достоверные различия по числу живых стволовых клеток в среде культивирования в зависимости от присутствия регуляторных факторов FGF и LIF (таблица). Фактор IL-2 не оказывал заметного влияния на эти клетки, FGF – стимулировал, а LIF, напротив, понижал их жизнеспособность после 96 ч инкубирования в среде альфа-МЕМ с 10% фетальной сыворотки ($p=0.05$).

Таблица – Жизнеспособность МСК КМ КРС через 96 ч в зависимости от присутствия экзогенных факторов в среде культивирования

% живых клеток				
Культура клеток	контроль	FGF	LIF	IL-2
МСК КМ КРС	80.1	83.2	77.2	81.9

Примечание – достоверность различий усредненных значений жизнеспособности МСК КМ КРС между FGF и контролем ($t_s= 9.4$; $P = 0.01$), между LIF и контролем ($t_s= 5.9$; $P = 0.01$), между IL-2 и контролем ($t_s= 1.9$; $P = 0.05$)

Полагаем, что одной из причин снижения жизнеспособности МСК КМ КРС может быть неспецифическое повышение проницаемости плазматических мембран в присутствии этого фактора [1], в результате чего краситель пропидиум йодид легко проникает в стволовые клетки и связывается с

ДНК. Такое объяснение вполне соответствует той морфологической картине, которую мы наблюдаем в ходе первых 2 суток культивирования стволовых клеток с LIF (рисунки 1, 2). Повышение проницаемости клеточных мембран сопровождается эпителизацией монослоя, увеличением его плотности. В присутствии FGF в популяциях МСК КМ активируются процессы гемообразования [6] и кардиомиогенеза [4], что может влиять на морфологию монослоя. Цитокин LIF, как и FGF, может активировать дифференцировку стволовых клеток в кардиомиоциты [5].

Согласно нашим данным, МСК КМ КРС являются мишенями для регуляторных факторов FGF и LIF. Мы не исключаем, что под влиянием этих факторов в первичных культурах МСК КМ КРС возможны мезенхимно-эпителиальные переходы. В норме такие процессы характерны для клеток в период раннего эмбриогенеза, а также при развитии клеточной патологии, связанной со спонтанной или индуцируемой трансформацией. Отсутствие влияния IL-2 на морфологию и жизнеспособность МСК КМ КРС свидетельствует о том, что стволовые клетки этого вида не восприимчивы к сигнальной трансдукции, поскольку интерлейкин-2 на них не действует.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Борисова, М.П. Действие фактора LIF на липидный бислой/ М.П. Борисова, Л.М. Межевикина [и др.]. –Биофизика, 2009.–Т. 54. – Вып. 4. – С.688–692.
- 2 Косовский, Г.Ю. Методические рекомендации по выделению и культивированию мезенхимных стволовых клеток (МСК) из костного мозга животных. Российская академия сельскохозяйственных наук, отделение ветеринарной медицины. – Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности. – Москва, 2009. – 20с.
- 3 Косовский, Г.Ю. Индукция остеогенной дифференцировки МСК. Получение дифференцированных клеток и ткани *in vitro*/ Г.Ю. Косовский, Ю.В. Поттириди, Д.М. Рихмаер [и др.]. – Ветеринария и кормление. – 2014. – № 6. – С. 53–56.
- 4 Лобанок, Е.С. Влияние фактора роста фибробластов FGF2 на кардиомиоцитарную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток костного мозга *ex vivo*/ Е.С. Лобанок, З.Б. Квачева [и др.]. – Биофизика, 2014. – Т. 49. – Вып. 2. – С. 360–368.
- 5 Петрова, Р.Р. Дифференцировка эмбриональных стволовых клеток мыши в условиях пролонгированного культивирования с рекомбинантным белком/ Р.Р. Петрова, Л.М. Межевикина [и др.]. – LIF. Цитология, 2007. – Т. 49.– № 9. – С. 782–783.
- 6 Полешко, А.Г. Процесс гемообразования в мезенхимальных стволовых клетках костного мозга при их культивировании с фактором роста фибробластов bFGF в условиях гипоксии/ А.Г. Полешко, Е.С. Лобанок [и др.]. – Биофизика, 2014.– Т. 49. – Вып. 6. – С.1150–1155.
- 7 Adamson, E.D. Activities of growth factors in preimplantation embryos/ J. Cell. Biochem, 1993.– V. 53. – P.280–287.
- 8 Stewart, C.L., Cullinan, E.B. Preimplantation development of the mammalian embryo and its regulation by growth factors. Dev. Genet., 1997. – V. 21. – P. 91–101.

УДК 619:636:612.017.11/.12:615.371

**СОСТОЯНИЕ ИММУНИТЕТА КОРОВ ПОСЛЕ
ПРИМЕНЕНИЯ АССОЦИИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ
ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ, ИНФЕКЦИОННОГО
РИНОТРАХЕИТА И ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ**

П.А. КРАСОЧКО, И.А. КРАСОЧКО, Д.С. БОРИСОВЕЦ,
Н.М. АВЛАСКО, Л.Д. АНДРОСИК

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского»,
г. Минск, РБ*

Поступила в редакцию 16.10.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

В современных условиях ведения животноводства респираторные и желудочно-кишечные заболевания молодняка крупного рогатого скота занимают ведущее место, главным методом борьбы является их специфическая профилактика [4].

Проведенные ранее исследования по изучению роли вирусных агентов в этиологии пневмоэнтеритов у телят и эндометритов у коров доказывают, что в виде моноинфекций вирусные антигены встречаются реже, чем в виде ассоциаций. Для борьбы с гинекологическими болезнями коров и с целью создания колюстрального иммунитета телят используют иммунизацию стельных коров моно- и ассоциированными вакцинами [2, 3].

Вакцина, вне зависимости от набора в ней антигенов, в первую очередь должна вызывать выработку в организме специфических антител, уровень которых способен обеспечить иммунитет достаточной напряженности.

Целью исследований является изучение показателей иммунитета стельных коров после вакцинации их ассоциированной вакциной против парвовирусной инфекции, инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили на базе МТФ «Гатово» Минского района на основании разрешения ГУВ МСХП РБ. С целью проведения опыта было отобрано 10–15 голов коров 4–6 месяца стельности, которые были разделены на 2 группы по 5–7 голов в каждой.

Животных 1-ой опытной группы обрабатывали инактивированной ассоциированной вакциной против парвовирусной инфекции, инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи внутримышечно в области крупа в дозе 5,0 см³ на голову. Контрольным животным вводили по 5,0 см³ стерильного изотонического раствора натрия хлорида. Животных обрабатывали дважды с интервалом 14 дней. За коровами было установлено клиническое наблюдение в течение 60 дней.

Для изучения влияния вакцин на иммунологические показатели организма коров опытных и контрольной групп отбирали кровь до иммуниза-

ции, через 14, 28 и 56 дней после вакцинации.

При изучении показателей клеточного и гуморального иммунитета крупного рогатого скота в сыворотке крови определяли уровень специфических антител к вирусу диареи и инфекционного ринотрахеита – в РНГА; парвовирусу – в РТГА; содержание Т- и В-лимфоцитов – методом розеткообразования со стабилизированными эритроцитами барана и мыши по Д.К. Новикову и В.И. Новиковой (1979) [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты изучения иммунного ответа стельных коров в поствакцинальный период при иммунизации их ассоциированной вакциной представлены в таблице 1 и на рисунке 1.

Таблица 1 – Титры противовирусных антител в сыворотке крупного рогатого скота при иммунизации их ассоциированной вакциной

Дни взятия крови	Группы	Титр антител ($\log_2$)		
		парвовирусная инфекция	инфекционный ринотрахеит	вирусная диарея
исходные данные	опытная	5,6±0,40	2,75±0,25	2,6±0,24
	контроль	5,8±0,37	2,8±0,20	3,2±0,20
через 14 дней	опытная	8,2±0,66**	3,2±0,20	3,6±0,24
	контроль	5,6±0,40	2,8±0,20	2,6±0,24
через 28 дней	опытная	9,6±0,93**	4,4±0,51*	4,2±0,20*
	контроль	5,2±0,20	2,6±0,24	3,2±0,20
через 56 дней	опытная	10,4±0,40**	6,2±0,37**	5,8±0,37**
	контроль	4,2±1,07	2,5±0,29	3,0±0,41

Примечание – * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$

Анализируя влияние иммунизации стельных коров ассоциированной вакциной против парвовирусной инфекции, инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи, необходимо отметить, что достоверное увеличение титров против всех вакцинных штаммов наблюдается через 14 дней после повторной иммунизации. Титры антител против парвовируса увеличились на 58,3%, против вируса инфекционного ринотрахеита – на 62,5%, против вируса диареи – на 61,9%. Более высокие показатели титров к антигенам зафиксированы через 28 дней после повторной иммунизации и составляли $10,4 \pm 0,40 \log_2$ ($P \leq 0,01$) к парвовирусу, $6,2 \pm 0,37 \log_2$ ($P \leq 0,01$) – к вирусу инфекционного ринотрахеита и $5,8 \pm 0,37 \log_2$ ($P \leq 0,01$) – к вирусу диареи.

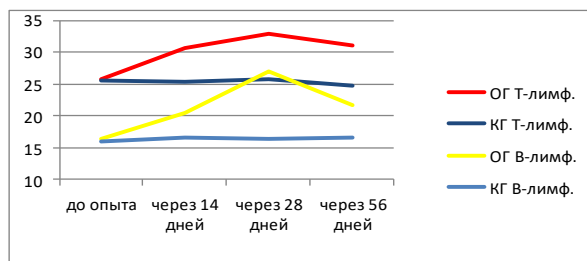


Рисунок 1 – Динамика содержания Т- и В-лимфоцитов в крови стельных коров в поствакцинальный период

Анализируя данные, приведенные на рисунке 1, можно наблюдать усиление клеточной активности у коров в поствакцинальный период. После первичной вакцинации животных в крови на 14 дней регистрируется увеличение количества Т-лимфоцитов – $30,8 \pm 0,86$ ($P \leq 0,05$). К 28 дню наблюдения в крови у вакцинированных животных опытной группы наблюдается достоверное увеличение ($P \leq 0,01$) уровня Т-лимфоцитов по сравнению с показателями в контрольной группе, к 56 дню регистрируется постепенное снижение количества Т-лимфоцитов в опытных группах.

При анализе данных рисунка 1 видно, что наиболее резкий скачок уровня В-лимфоцитов наблюдается у вакцинированных животных к 28 дню опыта ($27,0 \pm 0,84$ ($P \leq 0,001$)) в опытной группе. К 56 дню опыта количество В-лимфоцитов несколько снижается до $21,8 \pm 0,37$, данные изменения статистически достоверны ($P \leq 0,001$) по сравнению с показателями группы контроля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммунизация стельных коров инактивированной ассоциированной вакциной против парвовирусной инфекции, инфекционного ринотрахеита и вируса диареи способствует достоверному ($P \leq 0,01$) увеличению уровня специфических антител против вирусных агентов на $3,2\text{--}4,8 \log_2$ на 56 сут-ки после первичной вакцинации.

Увеличение количества Т- и В-лимфоцитов к 28-му дню опыта до $27,0\text{--}32,5\%$ ($P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$) свидетельствует об активизации клеточного иммунитета.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Болотников, И.А. Биохимические аспекты иммунологических реакций: Учебное пособие / И.А. Болотников [и др.]. – Петрозаводск, 1989. – 100 с.
- 2 Карпуть, И.М. Иммунология и иммунопатология болезней молодняка / И.М. Карпуть. – Минск: Ураджай, 1993. – 288 с.
- 3 Клиническая лабораторная диагностика: методы исследования: Учеб. пособие для студентов спец. «Фармация», «Клиническая фармация», «Лабораторная диагностика» вузов / И.А. Зупанец, С.В. Мисюрева, В.В. Прописнова [и др.]. Под ред. И.А. Зупанца. – 3-е изд., перераб. и доп. – Харьков: Изд-во НФаУ: Золотые страницы, 2005. – 200 с.
- 4 Рекомендации по специфической профилактике наиболее распространенных инфекционных болезней крупного рогатого скота в Республике Беларусь: утв. ГУВ МСХ и ПРБ 18 января 2007 г. / В.В. Максимович [и др.]. – Витебск: УО ВГАВМ, 2007. – 54 с.

УДК 636.2:612.323/.33

**ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА У КОРОВ
РАЗНЫХ ВОЗРАСТОВ ПРИ ИНТЕНСИВНЫХ
ТЕХНОЛОГИЯХ СОДЕРЖАНИЯ**

С.Н. МОТУЗКО, Н.С. МОТУЗКО

*«УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия
ветеринарной медицины», г. Витебск, РБ*

Поступила в редакцию 24.06.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Обмен веществ между организмом и внешней средой начинается с поглощения из этой среды веществ, соответствующих его природным потребностям – корма, воды и кислорода воздуха. Принятые из внешней среды в виде корма питательные вещества подвергаются в организме физическим и биохимическим превращениям; часть из них усваивается и ассимилируется организмом, неиспользованная часть удаляется из организма с калом, кишечными газами, мочой и углекислым газом выдыхаемого воздуха.

Поскольку потребность в питательных веществах у животных разных видов, возраста и направления продуктивности в силу функциональных и морфологических особенностей различны, питательность кормов не может быть для всех одинаковой и постоянной. Она может быть определена лишь в процессе взаимодействия корма и организма по изменению физиологического состояния животного и его продуктивности.

Представления о субстратном регулировании являются одной из наиболее важных и общих биологических теорий, где очень рано было понято значение субстратного регулирования в активизации пищеварительных процессов при различных условиях. Эта теория берет начало в классических исследованиях И.П. Павлова, касающихся регуляции деятельности желудочно-кишечного тракта и его приспособления к составу пищи. В последующих исследованиях она получила дальнейшее развитие, что нашло отражение в целом ряде работ [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7].

Суть субстратного регулирования состоит в том, что структурные и функциональные характеристики желудочно-кишечного тракта, в частности, ферментативной активности его органов, меняются в ответ на изменение состава корма.

Целью наших исследований стало изучение протеолитической активности слизистой и содержимого желудочно-кишечного тракта у коров разных возрастов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

По принципу аналогов было подобрано 3 группы коров по 9 животных в каждой группе : 1-я – коровы после первого отела, 2-я – коровы после

второго отела, 3-я – коровы после третьего отела. Материалом для исследования явились содержимое и слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта коров. Исследования проводились на кафедре нормальной и патологической физиологии животных УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате проведенных исследований установлено, что активность протеазы в содержимом и слизистой оболочке желудка составила у коров после первого отела $19,97 \pm 0,41$ мг/мл мин и $19,25 \pm 0,37$ мг/мл мин, после второго отела – $21,01 \pm 0,36$ мг/мл мин и $20,68 \pm 0,33$ мг/мл мин и после третьего отела – $18,59 \pm 0,26$ мг/мл мин и $17,72 \pm 0,22$ мг/мл мин соответственно (рисунок 1).

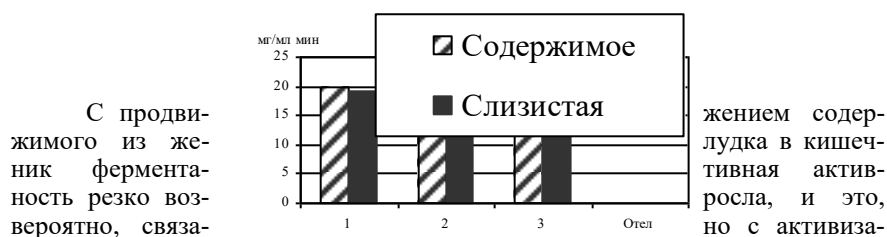


Рисунок 1 – Активность протеазы в желудке у коров разных возрастов

цией работы поджелудочной железы. Так протеолитическая активность в содержимом и слизистой оболочке 12-перстной кишки возросла и составила у коров после первого отела $36,46 \pm 0,52$ мг/мл мин и $32,57 \pm 0,48$ мг/мл мин, второго отела – $38,47 \pm 0,42$ мг/мл мин и $36,51 \pm 0,58$ мг/мл мин, третьего отела – $24,29 \pm 0,29$ мг/мл мин и $23,87 \pm 0,31$ мг/мл мин соответственно (рисунок 2).



Рисунок 2 – Активность протеазы в 12-перстной кишке у коров разных возрастов

В тощей кишке активность протеазы содержимого снизилась от 23% до 31%, а в слизистой – с 6% до 29% по отношению к 12-перстной кишке ($p < 0,001$) (рисунок 3).

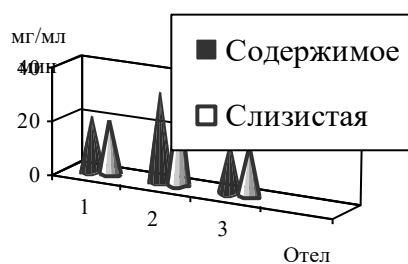


Рисунок 3 – Активность протеазы в тощей кишке у коров разных возрастов

Высокий уровень протеолитической активности отмечался и в подвздошной кишке коров: у животных после второго отела в содержимом и слизистой оболочке она составила $28,16 \pm 0,37$ мг/мл мин и $25,87 \pm 0,41$ мг/мл мин соответственно. Это достоверно выше ($p > 0,01$), чем у коров после первого и третьего отелов (рисунок 4).

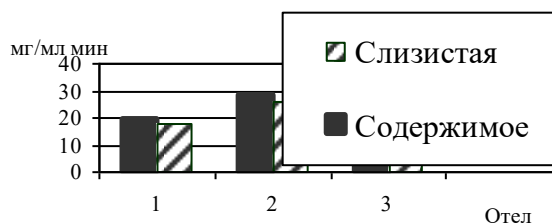


Рисунок 4 – Активность протеазы в подвздошной кишке у коров разных возрастов

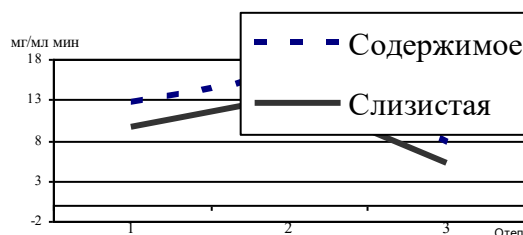


Рисунок 5 – Активность протеазы в слепой кишке у коров разных возрастов

Такое же соотношение протеолитической активности отмечалось и в слепой кишке толстого кишечника (рисунок 5).

По ходу продвижения содержимого по желудочно-кишечному тракту незначительная активность протеазы выявлена в содержимом ободочной кишки. А в прямой кишке ее активность отсутствовала как в содержимом, так и в слизистой оболочке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что помимо метаболических адаптаций к увеличенному поступлению соответствующих питательных веществ, по-видимому, существует также адаптация систем взаимодействия гидролиза и транспорта. При этом адаптация протеолитической активности наиболее выражена у коров после второго отела, тогда как после первого отела она еще не сформировалась, а после третьего отела произошло ее угнетение.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Интенсификация производства молока: опыт и проблемы: монография / В.И. Смунов [и др.]. – Витебск: ВГАВМ, 2012. – 486 с.
- 2 Покровский, А.А. Роль биохимии в развитии науки о питании. Некоторые закономерности ассимиляции пищевых веществ на уровне клетки и целостного организма / А.А. Покровский. – М.: Наука, 1974. – 127 с.
- 3 Совершенствование технологических процессов производства молока на комплексах: монография / Н.С. Мотузко [и др.]. – Минск: Техноперспектива, 2013. – 481 с.
- 4 Технологические и физиологические аспекты выращивания высокопродуктивных коров: монография / В.И. Смунов [и др.]. – Витебск: ВГАВМ, 2014. – 320 с.
- 5 Уголев, А.М. Взаимоотношения ферментативных функций поджелудочной железы и тонкой кишки при адаптивных процессах / А.М. Уголев [и др.]. – Физиол. журнал СССР. – 1978. – Т. 64. – № 9. – С. 1217–1228.
- 6 Уголев, А.М. Пищеварение и его приспособительная эволюция / А.М. Уголев. – М.: Высшая школа, 1961. – 306 с.
- 7 Физиологические и технологические аспекты повышения молочной продуктивности: монография / Н.С. Мотузко [и др.]. – Витебск: ВГАВМ, 2009. – 486 с.

УДК 619:616.5-002.828-085.371-097:636.2.053

ИММУННЫЙ СТАТУС ТЕЛЯТ ПОД ВЛИЯНИЕМ БАЦИНИЛА ПРИ ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ ТРИХОФИТИИ

МУРАД МААЛУФ БЕШАРА ТОНИ¹, В.Н. АЛЕШКЕВИЧ¹,
П.А. КРАСОЧКО²

¹УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная
академия ветеринарной медицины», г. Витебск, РБ

²РУП «Институт экспериментальной ветеринарии
им. С.Н. Вышеслесского», г. Минск, РБ

Поступила в редакцию 25.06.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

В комплексе мероприятий по борьбе с трихофитией ведущую роль отводят специфической профилактике. Однако иммунизация молодняка крупного рогатого скота не всегда дает ожидаемые результаты, ввиду иммунодепрессивного состояния из-за влияния на организм различных неблагоприятных факторов, связанных, в первую очередь, с неудовлетворительным кормлением животных и содержанием их в антисанитарных условиях.

Для повышения эффективности иммунизации, наряду с улучшением условий содержания и кормления животных, важное значение имеет стимуляция поствакцинального иммунитета иммуностимулирующими препаратами. Они нормализуют функциональное состояние иммунной системы и обеспечивают полноценный иммунный ответ у вакцинированных телят, что ведет к формированию у животных напряженного и длительного иммунитета [1, 2].

У животного нормальная микрофлора желудочно-кишечного тракта играет важную роль в физиологическом развитии и общем метаболизме. Она стимулирует иммунную систему быстро реагировать на внедрение патогенов и через бактериальный антагонизм ингибировать колонизацию кишечника вредными или патогенными бактериями [4].

За последние 2–3 десятилетия накоплен большой багаж знаний о роли микрофлоры желудочно-кишечного тракта в поддержании иммунного гомеостаза. Однако вопрос о возможности использования пробиотических препаратов для модуляции иммунного ответа, в частности, для укрепления противoinфекционной защиты, во многих аспектах остается объектом исследования и дискуссии.

Цель исследований – изучение влияния ветеринарного препарата «Бацинил» на микробиоценоз желудочно-кишечного тракта и иммунный ответ организма телят при вакцинации их сухой живой вакциной против трихофитии крупного рогатого скота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В опытах были задействованы 2 группы телят по 10 голов в возрасте 20 дней, живой массой 25–40 килограммов. Животным 1-й группы в период вакцинаций против трихофитии и последующие два дня после них выпаива-

ли с физраствором пробиотический препарат бацинил в объеме 10 мл из расчета на животное один раз в день. Вторая группа (контрольная) бацинил не получала, им вводилась только сухая живая вакцина против трихофитии крупного рогатого скота производства ОАО «БелВитунифарм».

У телят брали кровь и фекалии перед иммунизацией, через 10 дней после 1-ой вакцинации, на 30-й день после 2-ой вакцинации. В крови определяли гематологические и биохимические показатели, используя анализаторы Medonic CA-620 и Cormay Lumen, а также фагоцитарную активность лейкоцитов, бактерицидную (БАСК) и лизоцимную (ЛАСК) активность сыворотки крови по И.М. Карпутю [3], титры противотрихофитиных агглютининов, микрофлору кишечного содержимого животных.

Титры противотрихофитиных агглютининов определяли согласно «Методическим указаниям по лабораторной диагностике дерматофитозов животных», утвержденным Главным управлением ветеринарии с Государственной ветеринарной и Государственной продовольственной инспекциями Министерства с/х и продовольствия РБ от 27.11.2007 г, №10-1-5/1022.

В кишечном содержимом телят определяли количество аэробной, факультативно-анаэробной, анаэробной микрофлоры, грибов. Для выделения микроорганизмов вначале готовили 10-кратные разведения свежих отобранных фекалий. Полученные разведения 1:10 до 1:10⁹ засеивали на плотные питательные среды: МПА, Эндо, энтерококковый агар, солевой агар, тиогликолевую среду, агар Сабуро, агар Цейслера. После инкубирования подсчитывали колонии микроорганизмов каждого вида, выросшие на поверхности сред. Пересчет вели на 1 г фекалий с учетом степени разведения. Бактериологический анализ кишечной микрофлоры включал количественное и качественное определение следующих микроорганизмов: бифидобактерии, лактобактерии, энтерококки, эшерихии, стафилококки, клостридии, протей и другие энтеробактерии, псевдомонады, кандиды по общепринятым методам бактериологического исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ходе изучения микробиоценоза кишечного содержимого установлено, что до проведения исследований у телят обеих групп отмечалась схожая картина состава микрофлоры. Она характеризовалась снижением содержания облигатной микрофлоры и ростом числа факультативной и условно-патогенной микрофлоры. Так, количество бифидобактерий у телят, взятых в опыт, не превышало 3,84±2,43 – 4,45±2,34 lg КОЕ/г фекалий, лактобактерий – 4,21±0,72 – 4,48±0,48 lg КОЕ/г фекалий. Однако у 12 животных (60%) количество вышеуказанных бактерий составляло 10⁶–10⁸ КОЕ/г фекалий и 10⁷–10⁹ КОЕ/г соответственно, что соответствует их содержанию у здоровых телят согласно литературным источникам.

Содержание типичной *E. coli* у 60% животных было снижено и регистрировалось на уровне 8,14±1,12 – 8,65±0,34 lg КОЕ/г фекалий, в кишечном содержимом этих телят было отмечено присутствие также лактозонегативных и гемолитических штаммов *E. coli* – 21,6±0,18 – 23,4±0,42 lg КОЕ/г. Кроме того, в кишечном содержимом в 75%, 40%, 30%, 50%, 75%, 30% случаев соответственно присутствовали *Pr. vulgaris* – 5,21±0,12 – 6,46±0,34 lg КОЕ/г, энтерококки – 4,22±0,74–5,8±0,46 lg КОЕ/г, *Citrobacter* – 3,12±0,12 –

3,22±0,21 lg КОЕ/г, *Staph. aureus* – 5,28±0,75 – 5,74±0,47 lg КОЕ/г, *Cl. Perfringens* – 4,29±1,2 – 4,8±0,61 lg КОЕ/г, *Ps. aeruginosa* – 2,11±0,62 – 2,9±0,53 lg КОЕ/г. Также выявлялись дрожжеподобные грибы рода *Candida* в пределах 5,6±0,47 – 7,23±0,34 lg КОЕ/г у 10 (50%) обследованных телят.

Выпаивание телятам бацинила во время вакцинации в течение трех дней сдерживало формирование популяции стафилококков, дрожжеподобных грибов, условно-патогенных энтеробактерий, способствовало увеличению количества *E. coli* с нормальной ферментативной активностью, отсутствию гемолитических штаммов и штаммов с измененной ферментативной активностью и стимулировало рост бифидо- и лактобактерий до 9,26±0,84 – 9,86±0,2 lg КОЕ/г, 10,44±0,5 – 10,5±0,12 lg КОЕ/г фекалий соответственно.

Содержание белкового спектра и иммуноглобулинов в крови животных имеет большое диагностическое и прогностическое значение, которое отражает степень интенсивности течения процессов обмена веществ и уровень неспецифической резистентности организма.

Исследования показали, что при вакцинации телят против трихофитии содержание общего белка достоверно увеличивалось у телят всех групп. При этом у животных, получавших бацинил, содержание общего белка было выше, чем в контрольной группе. Так у телят опытной группы его фоновый уровень составлял 48,9±3,6 г/л, на 10 сутки от начала применения пробиотика регистрировался на уровне 65,02±3,8 г/л, на 30 сутки – 66,77±1,4 г/л. У животных контрольной группы содержание общего белка было – 44,1±5,0; 58,13±3,6; 60,38±2,7 г/л соответственно.

Анализируя содержание белковых фракций в сыворотке крови телят всех опытных групп, следует отметить, что содержание альбуминов по срокам опыта незначительно понижалось и регистрировалось у животных 1-ой группы на уровне: до начала исследований – 48,8±5,6 г/л; на 10-й день от начала выпойки пробиотического препарата – 46,5±1,2 г/л; на 30-й день – 40,7±2,2 г/л, соответственно у животных контрольной группы – 47,1±2,9 г/л; 44,9±1,2 г/л; 43,6±3,7 г/л.

Уровень α-глобулинов сыворотки крови телят также возрастал и находился в пределах 19,58±1,4 г/л, 19,82±0,7 г/л, 22,14±1,0 г/л и 15,34±0,5 г/л, 16,66±2,1 г/л, 21,3±0,7 г/л соответственно. При этом следует отметить, что увеличение фракции α₂-глобулинов в отличие от фракции α₁-глобулинов у всех животных обеих опытных групп было незначительным ($P \geq 0,05$) у телят 1-ой группы – на уровне 11,1±0,2 г/л, 12,68±0,7 г/л, 12,64±0,7 г/л, 2-ой – 10,69±0,4 г/л, 11,78±0,1 г/л, 12,4±0,4 г/л.

Исследованиями установлено повышение β-глобулиновой и γ-глобулиновой фракции сывороточных белков. В начале эксперимента их количество у телят опытной группы было на уровне 15,23±0,7 г/л, 18,0±0,9 г/л, а контрольной группы – 13,11±0,8 г/л, 16,0±0,7 г/л, к 30 дню – 17,52±0,5 г/л, 24,75±2,2 г/л и 15,44±0,8 г/л, 19,68±2,9 г/л соответственно.

Следовательно, отмеченные изменения белкового спектра в крови телят свидетельствуют о положительном биокорректирующем и иммунокорректирующем влиянии на процессы обмена веществ и иммунный статус ор-

ганизма животных.

В результате изучения влияния бацинила на показатели неспецифических факторов иммунитета установлено, что до начала проведения эксперимента у телят 1-й и 2-й групп содержание лейкоцитов, эритроцитов, гематокрита и гемоглобина было соответственно $9,05 \pm 0,43$ и $7,87 \pm 0,56 \cdot 10^9/\text{л}$; $4,12 \pm 0,24$ и $4,83 \pm 0,12 \cdot 10^{12}/\text{л}$; $27,9 \pm 1,2$ и $18,5 \pm 2,3 \%$; $75,2 \pm 3,2$ и $73,2 \pm 5,4 \text{ г/л}$.

В результате применения бацинила у телят опытной группы достоверно ($P \leq 0,05-0,01$) повышалось содержание абсолютного числа лейкоцитов до $13,4 \pm 1,28 \cdot 10^9/\text{л}$; гемоглобина – до $95,6 \pm 5,8 \text{ г/л}$; эритроцитов – до $10,05 \pm 3,35 \cdot 10^{12}/\text{л}$ по сравнению с животными контрольной группы соответственно $10,88 \pm 0,11 \cdot 10^9/\text{л}$; $91,8 \pm 3,0 \text{ г/л}$; $9,66 \pm 1,59 \cdot 10^{12}/\text{л}$.

Следует отметить, что количество нейтрофилов в крови телят контрольной группы было выше, чем в крови опытных телят, но не достоверно выше верхней физиологической нормы ($P \geq 0,05$). В опытной группе при снижении количества палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов отмечено увеличение содержания лимфоцитов на $7,4-8,1 \%$ и моноцитов на $31,8-46,6 \%$, что свидетельствует о повышении резистентности организма.

Применение пробиотического препарата «Бацинил» оказало позитивное влияние на уровень Т- и В-лимфоцитов. Их количество соответственно у телят 1-ой группы регистрировалось перед иммунизацией на уровне $41,5 \pm 0,92\%$ и $10,5 \pm 0,52\%$, 2-ой – $35,8 \pm 0,62\%$ и $8,4 \pm 0,81\%$; через 10 дней после первой иммунизации – $42,7 \pm 1,13\%$, $14,9 \pm 0,81\%$ и $39,2 \pm 0,56\%$, $11,2 \pm 0,64\%$, на 30 день после 2-ой иммунизации – $44,4 \pm 0,71\%$, $16,5 \pm 1,17\%$ и $40,6 \pm 1,33\%$, $11,4 \pm 0,55\%$.

Отмечено также увеличение в крови телят, получавших бацинил, фагоцитарной активности лейкоцитов крови на $6,8-8,6 \%$, при этом фагоцитарный индекс у телят опытной группы на 30 сутки после 2-ой иммунизации был $2,58 \pm 0,13$, контрольной – $2,12 \pm 0,12$; ЛАСК на $3,2-3,85 \%$ и БАСК – на $23-24,5 \%$ по сравнению с животными, не получавшими его ($P \leq 0,01-0,001$).

На фоне применения бацинила содержание глюкозы в крови телят, первой группы от начала постановки опыта достоверно повысилось к 30 дню после 2-ой вакцинации на $2,03 \text{ мкмоль/л}$ ($P \leq 0,01$). У животных контрольной группы ее содержание в крови также увеличивалось, и в дальнейшем эти данные не имели существенных различий по сравнению с показателями животных опытной группы.

В сыворотке крови телят обеих групп регистрировалось повышение количества цинка и меди с $9,85-11,98 \text{ мкмоль/л}$ и $25,7-47,62 \text{ мкмоль/л}$ до $15,4 \pm 2,46-17,9 \pm 2,71 \text{ мкмоль/л}$ и $47,39 \pm 9,97-56,09 \pm 9,35 \text{ мкмоль/л}$ соответственно. При этом их содержание было несколько выше у животных первой группы.

Количество триглицеридов у всех телят, наоборот, уменьшилось и составляло на начало опыта $0,27 \pm 0,12-0,54 \pm 0,13 \text{ мкмоль/л}$, а к 30 дню после 2-ой вакцинации – $0,11 \pm 0,04-0,19 \pm 0,06 \text{ мкмоль/л}$.

Выпаивание бацинила и вакцинация телят против трихофитии стимулировали в итоге продукцию специфических антител плазматическими

клетками. Максимальный титр противотрихофитиновых антител в сыворотки крови телят контрольной группы составил $7,3 \log_2$, а опытной – $8,3 \log_2$. До иммунизации у всех телят противотрихофитиновых агглютининов не обнаружено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение пробиотического препарата «Бацинил» в дозе 10,0 мл на животное три дня подряд совместно с вакцинацией телят против трихофитии нормализует микробиоценоз желудочно-кишечного тракта животных, усиливает естественную резистентность, повышая бактерицидную и лизоцимную активность сыворотки крови телят, фагоцитарную активность лейкоцитов крови, способствует увеличению содержания гемоглобина, эритроцитов и лейкоцитов в крови, повышению титров специфических антител, что свидетельствует об интенсификации иммунного ответа и целесообразности применения данного препарата при вакцинации животных против трихофитии.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Борознов, С.Л. Повышение резистентности в профилактике желудочно-кишечных заболеваний телят / С.Л. Борознов, И.М. Карпуть, П.А. Красочко, М.П. Бабина // Меж. научно-практический журнал «Эпизоотология Иммунология Фармакология Санитария». – 2006. – №3. – С.36–40.
- 2 Габриэлян, Н.И. Изучение влияния пробиотика споробактерина на функциональное состояние гранулоцитарно-макрофагальных клеток крови *in vitro* / Н.И. Габриэлян, В.С. Сускова, С.И. Сусков, Н.Л. Вологодская // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – М., 2012. – Том 153. – №5. – С. 653 – 655.
- 3 Карпуть, И.М. Иммунология и иммунопатология болезней молодняка / И.М. Карпуть. – Мн.: Ураджай, 1993. – 88 с.
- 4 Тараканов, Б.В. Механизм действия пробиотиков на микрофлору пищеварительного тракта и организм животных/ Б.В. Тараканов // Ветеринария. – 2000. – №1. – С. 47–55.

УДК 619:615,371:619:616.2-053.2

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ НОВОРОЖДЕННЫХ ТЕЛЯТ ПРИ ВАКЦИНАЦИИ ГЛУБОКОСТЕЛЬНЫХ КОРОВ С ГЛИКОПИНОМ

Г.И. УСТИНОВА, О.Д. КУЧЕРУК, Е.В. ЖУКОВА, А.Г. ЛУЧКИН,
Е.М. СОШНИКОВА

*ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко», г. Москва, РФ*

Поступила в редакцию 26.06.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Ведущая роль в защите новорожденных животных от инфекционных заболеваний принадлежит пассивному материнскому иммунитету, медиаторами которого являются антитела, поступающие с молозивом и молоком матери, так как иммунная система в поздний эмбриональный и начальный неонатальный период еще не сформирована [4]. По мнению ряда ученых иммунизация телят в раннем возрасте (менее 30–40 суток жизни) также нецелесообразна по причине нейтрализации вакцинного вируса колюшечными антителами [5].

Парентеральное введение антигена матерям стимулирует, как правило, образование и повышение титра сывороточных антител класса IgG и обеспечивает пассивный системный иммунитет у новорожденных при условии, что они потребляют достаточное количество «иммунного» молозива в первые 12–36 часов жизни.

Успех вакцинации во многом зависит от качества антигена и способа его применения: доза, кратность вакцинации, интервалы между прививками, метод аппликации антигена. Большое значение при этом имеет состояние организма самого вакцинируемого животного. К сожалению, не для всех инфекционных болезней созданы вакцинные препараты, обеспечивающие надежную защиту животных. В течение ряда лет ветеринарной наукой накоплен некоторый опыт применения гликопина в качестве иммуномодулятора с противобактериальными и противовирусными вакцинами.

Гликопин – ветеринарный препарат, действующим веществом которого является N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин (ГМДП), созданный в Институте биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН [6], путем прямой конденсации синтетического дипептида – L-аланил-D-изоглутамина, с дисахаридом – N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамом, выделенным из клеточной стенки *Micrococcus lysodeikticus*.

ГМДП представляет собой общий повторяющийся фрагмент пептидогликана клеточной стенки всех известных бактерий [1]. Главной мишенью для него являются макрофаги [2]. Гликопин усиливает фагоцитоз микроорганизмов, повышает ферментативную активность, продукцию активных форм кислорода и, следовательно, микробицидную активность [1], сти-

мулирует секреторную активность макрофагов, которая проявляется в усилении синтеза цитокинов: происходит усиление экспрессии поверхностных белков макрофагов, участвующих в представлении антигена, стимулирующих пролиферацию и дифференцировку Т- и В-лимфоцитов. Таким образом, он влияет как на неспецифические защитные реакции к инфекциям (фагоцитоз), так и на специфическое звено иммунитета (представление антигена Т-лимфоциту), следствием чего является усиление синтеза антител к ряду антигенов [1, 3].

Целью наших исследований было изучение возможности повышения специфической резистентности новорожденных телят при вакцинации стельных коров с гликопином от различных вирусных болезней.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Первым этапом исследований было изучение влияния иммунизации глубокостельных коров вакциной с гликопином на колостральный иммунитет новорожденных телят при профилактике инфекционного ринотрахеита.

В эксперименте использовали 40 коров, за 50–55 суток до отела вакцинированных вакциной «Комбовак – Р» в дозе 3 мл, и 20-ти из них параллельно с повторной вакцинацией дополнительно ввели внутримышечно гликопин в дозе 3 мг в 2 мл физиологического раствора. Повторную иммунизацию 40 коров проводили через 14 суток. Из полученного потомства отобрали по принципу аналогов 10 телят от коров, иммунизированных гликопином (опытная группа), и 10 телят от коров, иммунизированных одной вакциной (контрольная группа). Взятие крови у коров для исследований проводили до начала опыта, перед ревакцинацией и на 21-е сутки после ревакцинации, у телят – на 2-е и 10-е сутки жизни.

На втором этапе проводили аналогичные исследования на 50 глубокостельных коровах и их приплоде при проведении иммунизации вакциной «РотавекО Корона». Вакцину вводили согласно наставлению.

Эффективность сочетанного применения вакцин и гликопина оценивали по следующим показателям: уровню специфических антител к вирусу ИРТ в РН, к рота- и коронавирусу в ИФА, фагоцитарной активности нейтрофилов, уровню иммуноглобулинов классов М и G, относительному количеству Т- и В-лимфоцитов, лизоцимной и бактерицидной активности сыворотки крови по стандартным методикам. Эпизоотическую эффективность совместного применения вакцины и иммуномодулятора определяли по уровню заболеваемости и гибели телят.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Нашими исследованиями установлено, что при дополнительном внутримышечном введении гликопина стельным коровам в сочетании с комбинированной вакциной достоверно увеличивались титры антител к вирусу ИРТ: в сыворотке крови – до 9,8 и в молозиве – до 14,2 $\log_2$ в сравнении с 8,4 (в сыворотке крови) и 10,3 $\log_2$ (в молозиве) у животных контрольной группы, что было на 17 и 38% соответственно больше. Концентрация иммуноглобулинов М и G в сыворотке крови коров подопытной

группы после отела была выше, чем в контроле на 24 и 67% соответственно. Фагоцитарная активность нейтрофилов у коров в опытной группе после отела была выше по сравнению с контрольной группой на 22,2%, бактерицидная активность сыворотки крови – на 25,2%, а лизоцимная активность сыворотки крови – на 34,4%.

Титры антител к вирусу ИРТ в сыворотке крови телят подопытной группы на 2-е и 10-е сутки были выше на 19 и 18% ($8,2 \pm 0,5 \log_2$ и $8,5 \pm 0,8 \log_2$), чем у контрольных животных ($6,9 \pm 0,1 \log_2$ и $7,2 \pm 0,1 \log_2$). Уровень IgM и IgG в сыворотке крови телят, получавших молозиво от матерей, вакцинированных в сочетании с гликопином, на вторые сутки жизни был на 21 и 12% соответственно выше, чем у контрольных животных, а на десятые – выше на 30 и 25% соответственно. Содержание В-лимфоцитов в крови телят опытной группы увеличилось на 2-е сутки после рождения на 50% по сравнению с контролем. Содержание Т-лимфоцитов в крови опытных телят на 2-е и 10-е сутки после рождения также увеличилось по сравнению с контрольными телятами на 25,26% и 23,9% соответственно.

Анализ данных, полученных при иммунизации коров вакциной «Ротавек О Корона», показал, что титры антител в сыворотке крови составили: к ротавирусу – $7,0 \pm 0,19 \log_2$, коронавирусу – $6,9 \pm 0,12 \log_2$. На 21 сутки после вакцинации у коров опытной группы титры антител к рота- и коронавирусу составили $10,2 \pm 0,17 \log_2$ и $9,6 \pm 0,11 \log_2$ соответственно, у животных контрольной группы – $7,8 \pm 0,13 \log_2$ и $7,3 \pm 0,15 \log_2$ соответственно. В молозиве коров опытной группы титры антител к рота- и коронавирусу составили $15,7 \pm 0,24 \log_2$ и $14,5 \pm 0,41 \log_2$ соответственно, у животных контрольной группы – $10,8 \pm 0,2 \log_2$ и $10,1 \pm 0,1 \log_2$ соответственно.

Результаты исследования иммунного статуса новорожденных телят, полученных от коров, вакцинированных с гликопином, показал достоверное увеличение относительного содержания Т- и В-лимфоцитов в крови телят опытной группы по сравнению с контролем, уровень иммуноглобулинов классов М и G в сыворотке крови телят, рожденных от коров, иммунизированных вакциной с гликопином, и получавших от них молозиво, был выше, чем у контрольных животных. Бактерицидная и лизоцимная активность сыворотки крови телят опытной группы были выше соответственно на 27,4 и 31,6% по сравнению с животными контрольной группы.

Сохранность телят в опыте составила 100% к ИРТ. Заболеваемость животных в контрольной группе составила 20% при отсутствии таковой в опытной группе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что иммунный ответ на введение глубокоостельным коровам вакцин «Комбовак-Р» и «Ротавек О Корона» с гликопином по интенсивности достоверно превышает иммунный ответ на введение только одних вакцин. Увеличение количества антител в молозиве этих животных обеспечивает более эффективную защиту телят в первые сутки жизни от вирусных инфекций.

ЛИТЕРАТУРА

1 Иванов, В.Т. Ликопид (глюкозаминилмурамилдипептид) – новый отечественный высокоэффективный иммуномодулятор для лечения и профилактики заболеваний, связанных со вторичной иммунологической недостаточностью / В.Т. Иванов, Р.М. Хаитов, Т.М. Андропова, Б.В. Пинегин // Иммунология. – 1996. – № 2. – С. 4 – 6.

2 Карсонова, М.И. Иммуностимулирующая активность мурамилдипептида и его производных / М.И. Карсонова, Т.М. Андропова, Б.В. Пинегин [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1999. – № 3. – С. 104 – 110.

3 Манько, В.М. Экспериментальное изучение иммуномодулирующего действия глюкозаминил-мурамил-дипептида (ГМДП). Влияние ГМДП на макрофагальное звено иммунного ответа, активацию Т- и В-лимфоцитов и их кооперативное взаимодействие / В.М. Манько, В.Ю. Скворцов, Т.Б. Мастернак [и др.] // Иммунология. – 1989. – № 2. – С. 23 – 26.

4 Сергеев, В.А. Вирусы и вирусные вакцины / В.А. Сергеев, Е.А. Неполонов, Т.И. Алипер. – Москва: Библионика, 2007. – 524 с.

5 Сюрин, В.Н. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев [и др.]. – Москва: ВНИТИБП, 1998. – 928 с.

6 Andronova, T. The structure and Immunological function of glucosaminylmuramyl peptides / T. Andronova, V.T. Ivanov // Sov. Medical Reviews. D. Immunology (Harwood Academic Publishers). – 1991. – Vol.4. – P. 1 – 63.

УДК:619:616–097.3

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ИММУННОГО СТАТУСА И СТРАТЕГИЯ ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ БОЛЕЗНЕЙ НОВОРОЖДЕННЫХ ТЕЛЯТ

Ю.Н. ФЕДОРОВ, О.А. БОГОМОЛОВА, М.Н. РОМАНЕНКО

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», г. Щелково, РФ

Поступила в редакцию 10.07.2015 г.

Интенсификация животноводства в современных условиях создает проблемы по сохранению телят в ранний постнатальный период. Высокая восприимчивость новорожденных телят к болезням связана с тем, что они рождаются лишенными основных защитных белков – иммуноглобулинов. Оценка иммунного статуса новорожденных животных является необходимым звеном в определении адекватности и своевременности получения молозива, являющегося источником иммуноглобулинов и формирования колострального иммунитета при потреблении молозива в первые часы после рождения. Абсорбционная способность кишечника иммуноглобулинов молозива сохраняется не более 36 часов и наиболее выражена в первые 6 часов после рождения. Иммунодефицитное состояние у телят, возникающее в связи с несвоевременным и неадекватным получением молозива, диагностируется при содержании в сыворотке крови IgG менее 8,0 мг/мл. Содержание IgG в сыворотке крови теленка более 10 мг/мл свидетельствует об адекватной пассивной передаче. Своевременное потребление и абсорбция молозивных иммуноглобулинов является необходимым условием для формирования устойчивости к заболеваниям в течение первых недель жизни телят [5].

В связи с этим одним из наиболее информативных показателей при оценке иммунного статуса новорожденных телят является количественное содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови. С этой целью используется ряд экспресс – методов: пробирочный тест с сульфитом натрия, турбидиметрический тест с сульфатом цинка, глутаровым альдегидом, рефрактометрический метод, простая радиальная иммунодиффузия по Манчини, иммуноферментный анализ, реакция латекс-агглютинации [1,6,7,8,9,10]. Наиболее точными и специфичными методами оценки количественного содержания иммуноглобулинов являются метод радиальной иммунодиффузии (РИД) и иммуноферментный анализ (ИФА). Однако длительность постановки РИД (24–48 час.) не позволяет своевременно диагностировать наличие иммунодефицитных состояний у новорожденных животных. В этом случае следует отдавать предпочтение экспресс-методам, которыми являются пробирочный тест с сульфитом натрия, несмотря на некоторую его вариабельность в оценке, а также ИФА и реакция латекс-агглютинации. Последние требуют определенного приборного обеспечения и специфических реагентов.

Пробирочный тест с сульфитом натрия. Принцип метода основан на том, что иммуноглобулины, которые появляются в сыворотке крови новорожденных животных после приема молозива, преципитируются растворами сульфита натрия (Na_2SO_3) в концентрации от 14 до 18% [4,9].

В пробирки разливают по 1,9 мл каждого из трех растворов (14%, 16% и 18%) и добавляют по 100 мкл (0,1 мл) испытуемой сыворотки крови. Содержимое пробирок тщательно встряхивают и оставляют при комнатной температуре на один час. При положительной реакции в пробирке появляется помутнение или выпадает осадок. Если помутнение или осадок наблюдается во всех трех пробирках, то содержание иммуноглобулинов квалифицируется как оптимальное (более 15,0 мг/мл). Отсутствие помутнения сыворотки крови с концентрацией сульфата натрия 14% оценивается как пониженный уровень иммуноглобулинов (5–15 мг/мл). Очень низкий уровень иммуноглобулинов устанавливается при отсутствии преципитации с концентрацией сульфата натрия 14% и 16% (менее 5,0 мг/мл). Отрицательная реакция во всех пробирках свидетельствует об отсутствии иммуноглобулинов в испытуемой сыворотке крови.

Простая радиальная иммунодиффузия. Метод основан на том, что иммуноглобулины испытуемых проб радиально диффундируют в агар, содержащий моноспецифическую антисыворотку или моноклональные антитела к иммуноглобулинам отдельных изомеров (IgG, IgM, IgA), образуя кольцо преципитации, диаметр которого прямо пропорционален концентрации иммуноглобулинов [2]. Диаметр колец преципитации стандартной сыворотки с известным содержанием иммуноглобулинов каждого изомера (мг/мл) измеряют линейкой с точностью до 0,1 мм и строят калибровочную кривую с использованием полулогарифмической бумаги. По линии абсцисс откладывают диаметр кольца преципитации различных разведений стандартной сыворотки, а по линии ординат – концентрацию иммуноглобулинов в мг/мл. Замеряют диаметр колец преципитации испытуемых проб и по оси абсцисс восстанавливают перпендикуляр до пересечения со стандартной кривой. Точку пересечения с этой кривой проецируют на ось ординат и определяют количество иммуноглобулинов.

Иммуноферментный метод (ИФА). В основу метода определения положен принцип твердофазного сэндвич-ИФА, при котором в качестве сенсibiliзирующего реагента используют моноспецифическую антисыворотку или моноклональные антитела к IgG, связывающие иммуноглобулин G исследуемой пробы. Образовавшийся комплекс выявляется конъюгатом анти-IgG антител, меченными ферментом пероксидазы. При добавлении субстратной смеси в результате ферментативной реакции образуется продукт, интенсивность окрашивания которого зависит от содержания IgG в исследуемой пробе [1,7]. Производят измерение оптической плотности проб на фотометре Титертек, Мультикан при 450 нм. По стандарту строят калибровочную кривую зависимости оптической плотности (ОП) от концентрации иммуноглобулина в стандартной сыворотке. Содержание IgG (мкг/мл) в исследуемой пробе определяют по среднему из трех значений ОП на стандартной кривой.

Реакция латекс-агглютинации. Метод основан на специфической агглютинации окрашенного полиакролеинового латекса, сенсibiliзированного антителами к IgG крупного рогатого скота, при взаимодействии его с IgG в исследуемых сыворотках крови пробы [3, 6].

Постановка реакции осуществляется в микротитровальных пластинах с U-образными лунками. Во все лунки пластины вносят по 25 мкл ФБСР и готовят двукратные разведения стандартной (с известным содержанием им-

муноглобулинов каждого изотипа) и испытуемых сывороток крови с 1:16 до 1:2048. Далее в каждую лунку вносят по 25 мкл ФБСР латекс – препарата, пластину встряхивают и оставляют при температуре 37⁰С 1,5–2 часа. Учет реакции и оценку результатов проводят по форме оседания суспензии латекс – препарата. Положительной считается реакция при наличии в лунке равномерного нежного окрашенного агглютината. Реакцию учитывают при отрицательном и положительном (наличие агглютината в ряду со стандартной сывороткой в разведении не ниже 1:512) контролях. За титр иммуноглобулинов принимают то наибольшее разведение сыворотки, в котором еще отмечается полная агглютинация латекс – препарата. Оценку иммунного статуса новорожденных животных проводят по количественному содержанию IgG в сыворотке крови.

- >1:512 (>18 мг/мл) – нормальное содержание иммуноглобулинов;
- <1:128 (<15 мг/мл) – пониженное содержание иммуноглобулинов;
- < 1:32 (< 5 мг/мл) – выраженный дефицит иммуноглобулинов.

Перечисленные тест-системы позволяют оценивать иммунный статус новорожденных телят, выявлять иммунодефицитное состояние.

Стратегия иммунопрофилактики болезней новорожденных телят.

Пассивный (колостральный) иммунитет является важнейшим фактором выживания новорожденных телят в ранний постнатальный период. Иммунодефицитное состояние, возникающее при несвоевременном и неадекватном в количественном отношении получении молозива, приводит к заболеваемости и высокой смертности [5,8]. В этиологической структуре инфекционной патологии новорожденных телят ведущее место занимают желудочно-кишечные болезни с синдромом диареи, в которых ведущая роль отводится таким патогенам, как ротавирус, коронавирус, энтеробактерии и криптоспоридии. Вирус диареи – болезни слизистых, обладая выраженным иммунодепрессивным действием, осложняет течение болезни и гибель животных может наблюдаться от инфекции, вызываемой другими патогенами. Криптоспоридии также рассматриваются как важный агент, вызывающий диарею в раннем постнатальном периоде у телят. Специфическая защита новорожденных телят от инфекционных болезней в первые часы после рождения осуществляется путем направленной иммунизации матерей с тем, чтобы стимулировать у них синтез специфических антител и передачу их с молозивом. Таким путем решается проблема профилактики желудочно-кишечных болезней у телят, таких как ротавирусная инфекция, коронавирусная инфекция, колибактериоз и сальмонеллез. Защита новорожденных телят от патогенных микроорганизмов, инвазирующих желудочно-кишечный тракт в первые часы после рождения, может быть достигнута только путем скармливания молозива матерей, содержащего антитела с широким спектром антиинфекционной активности. При этом, наряду с системной защитой организма, обусловленной нахождением в крови специфических антител, важное значение имеет местная защита, которая обеспечивается содержанием в просвете кишечника секреторных иммуноглобулинов А-изотипа, являющихся первым барьером на пути энтеропатогенов. Для профилактики желудочно-кишечных болезней у телят с симптомокомплексом диарея, проявляющихся в первые дни жизни (ротавирусная инфекция, коронавирусная инфекция, колибактериоз, сальмонеллез), рекомендуется вакцинация стельных коров: первая – за 4–6 недель

до отела, вторая – не позднее 2-х недель до отела. Телят, полученных от иммунизированных коров, не следует вакцинировать ранее 20–30-дневного возраста по причине антигенной интерференции со специфическими колостральными антителами, при которой ингибируется формирование поствакцинального иммунитета, а также из-за незрелости иммунной системы новорожденных телят, не позволяющей получить адекватный иммунный ответ на антигенное воздействие. Для формирования адекватной иммунной реакции требуется более продолжительный период времени, чем период который необходим для патогенных возбудителей, чтобы вызвать заболевание.

Иммунизация стельных коров вакциной, приготовленной на основе факторов патогенности эшерихий (адгезинов и энтеротоксинов) и своевременное получение телятами иммунного молозива, обеспечивает их защиту от различных форм колибактериоза. Такой же принцип используется и для профилактики сальмонеллеза телят. Возникновение вирусных желудочно-кишечных болезней у телят зависит от состояния колострального иммунитета и распространения патогенных штаммов вирусов в окружающей среде. Получение молозива от иммунизированных коров позволяет решить проблему вирусных инфекций у телят. При ротавирусной и коронавирусной инфекциях важная роль в защите отводится лактогенному иммунитету. Высокий уровень пассивно приобретенных антител снижает опасность возникновения болезней у телят в ранний постнатальный период. Установлена прямая связь между уровнем антител в молозиве, в сыворотке крови новорожденных телят и их защитой против возбудителей инфекционных болезней. Учитывая сложную этиологическую структуру желудочно-кишечных болезней у телят в первые дни после рождения, перспективно использование для иммунизации коров в период стельности ассоциированных вакцинных препаратов, содержащих в своем составе антигены энтеробактерий, рота- и коронавирусов.

Таким образом, в стратегии иммунопрофилактики болезней новорожденных телят необходимо иметь в виду, что новорожденные животные более восприимчивы к инфекциям, чем взрослые животные прежде всего потому, что они рождаются в состоянии агаммаглобулинемии и не имеют иммунитета к возбудителям инфекционных болезней. Наиболее эффективным средством предотвращения инфекционных болезней у новорожденных животных остается пассивный лактогенный иммунитет. При этом следует считать, что слабая иммунная реакция при введении различных вакцинных препаратов у телят после рождения или отсутствие таковой связано прежде всего с интерференцией материнских антител с антигеном и с незрелостью иммунной системы в этот период. Поэтому вакцинация телят с целью профилактики инфекционных болезней в каждом конкретном случае должна осуществляться с учетом уровня у них материнских антител. Снижение их до определенного уровня позволяет полностью реализовать генетически унаследованную способность организма отвечать на антигены, несущие на себе признаки генетически чужеродной информации [5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дальнейшее развитие клинической иммунологии в направлении оценки иммунного статуса животных связано с совершенствованием экспресс-методов диагностики иммунодефицитных состояний, обладающих достаточ-

ной чувствительностью и специфичностью и доступных для проведения мониторинга в полевых условиях. Они должны отвечать ряду требований: простая постановка реакции без особой аппаратуры, невысокая стоимость, быстрый и объективный учет результатов, что позволит своевременно осуществлять иммунокоррекцию в направлении повышения иммунного статуса и устойчивости к воздействию патогенов. В иммунопрофилактике болезней новорожденных телят определяющим является своевременное и адекватное получение молозива матерей, иммунизированных вакцинами, содержащими основные этиологически значимые антигенные структуры.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Борзенко, Е.В. Количественная характеристика иммуноглобулинов в биологических жидкостях крупного рогатого скота методами иммунохимического анализа/ Е.В. Борзенко// Диссертация кандидата ветеринарных наук. 2005. – 109 с.
- 2 Бэм, Э. Простая радиальная иммунодиффузия по Манчини / Э. Бэм // Иммунологические методы. – М.: Мир, 1987. – С. 49–57.
- 3 Воробьева, З.Г. Определение концентрации иммуноглобулинов с помощью реакции агглютинации латекса / З.Г. Воробьева [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика, 2000. – №5. – С.23–24.
- 4 Методические рекомендации по определению уровня иммуноглобулинов в крови новорожденных животных. Одобрено ГУВ МСХ СССР 22.02.1985 г.
- 5 Brenner, J. Passive lactogenic immunity in calves. A Review. //Israel J.Vet.Med.,1991,–46. – P.1–12.
- 6 Ernest C.A. Latex agglutination. Determination of IgG in neonatals and in colostrum. // Patent USA. 1985. –N4.–542.103.
- 7 Indyk, H.E. Determination of immunoglobulin G in bovine colostrum and milk by direct biosensor SPR-immunoassay/ H.E. Indyk [et al]//J. of AOAC International., 2003.–86,–2.–P. 386–393.
- 8 Pivont P., Antoine H., Gregoire R. Les tests de detection rapide de l' hypogammaglobuline-mie du veau nouveau-ne: comparaison et developments. //Ann. Med.Vet.,1982,126,8, – P. 621–628.
- 9 Pfeifer N.E., McGuire T.C. A sodium sulfite-precipitation test for assessment of colostral immunoglobulin transfer to calves.// J.Amer.Vet.Med.Asss.,1977, 170, 8. –P. 809–811.
- 10 White D.G. Evalution of a rapid specific test for detecting colostral IgG1 in the neonatal calf. // Vet.Record, 1986, –118, 3. – P. 68–70.

УДК 619:616.98:578.831.3:636.3

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММУНОСТИМУЛЯТОРА ПРИ ВИРУСНЫХ ПНЕВМОЭНТЕРИТАХ ТЕЛЯТ

П.А. КРАСОЧКО, Д.С. БОРИСОВЕЦ, Г.Е. ТОЛЯРОНОК

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского»,
г. Минск, РБ*

Поступила в редакцию 19.10.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

В этиологической структуре возбудителей болезней желудочно-кишечного тракта, как показали исследования, важная роль принадлежит вирусным агентам. К ним относятся, прежде всего, вирусы парагриппа-3, вирусной диареи, рота-, корона- и парвовирусной инфекций. Респираторные и желудочно-кишечные инфекционные заболевания у телят и поросят занимают первое место в среди других болезней. Так, на долю болезней дыхательной системы (вирусы парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита и др.) приходится 33,2–44%, на долю желудочно-кишечных заболеваний (вирусной диареи, рота-, корона- и парвовирусной инфекций) – 55–70% и до 100%. Смертность и вынужденный убой при инфекционных болезнях составляет от 5 до 50–70% от количества заболевших. Одновременное или последовательное инфицирование телят данными возбудителями приводит к длительному течению болезни и неблагоприятию хозяйств.

Это способствует активизации банальной условно-патогенной и сапрофитной микрофлоры, которая в значительной мере отягощает инфекционный процесс. Одним из предрасполагающих факторов поражения животных паразитарными и инфекционными заболеваниями является снижение иммунологической реактивности организма. Этому способствует ряд факторов – недоразвитость иммунной системы молодняка (первичный иммунодефицит), пищевые токсикозы, недостаточное и несбалансированное по различным компонентам кормление.

В этой связи разработка и внедрение в практику ветеринарии новых отечественных высокоэффективных иммуностимулирующих препаратов для вирусных и паразитарных болезней является одной из наиболее актуальных задач. Перспективным направлением в данной области является конструирование иммуностимуляторов, разработка и совершенствование технологий их производства.

Цель работы – отработать оптимальные терапевтические дозы препарата на сельскохозяйственных животных при вирусных заболеваниях животных; изучить влияние нового препарата на иммунитет.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ РАБОТЫ

Приготовленный иммуностимулирующий препарат для профилактики вирусных болезней животных – это липополисахаридная фракция, полученная из бактериальной массы *Bac. subtilis* штамм 22. Экспериментальный

образец представляет собой стерильную прозрачную слегка опалесцирующую жидкость с концентрацией сухого вещества липополисахарида 500 мкг/мл.

Для отработки терапевтических доз иммуностимулятора на сельскохозяйственных животных были отобраны телята 3–4-хмесячного возраста, живой массой 50–60 кг в количестве 30 голов. Применение препарата проводили по схеме, представленной в таблице 1.

Таблица 1 – Схема отработки оптимальных доз иммуностимулирующего препарата на основе бактериального липополисахарида на телятах

Группы животных	Доза препарата	Кратность введения	Количество животных в группе, гол
опытная группа № 1	5 мкг/кг	1 раз в день 3 дня подряд	10
опытная группа № 2	10 мкг/кг	1 раз в день 3 дня подряд	10
контрольная группа	–	–	10

Для изучения влияния на показатели гуморального и клеточного иммунитета были отобраны пробы крови до применения препарата и через 7, 14, 30 дней после его введения телятам. Определяли следующие **показатели клеточного иммунитета**: количество лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов, макрофагов, уровень розеткообразующих Т- и В-лимфоцитов по методике Д.К. Новикова, В.И. Новиковой, 1996; **показатели гуморального иммунитета**: количество циркулирующих иммунных комплексов – по методу Ю.А. Гриневич, И.И. Алферова, 1981; белковые фракции, включая иммуноглобулины, белки системы комплемента С₃ и др., иммунобиохимические показатели сыворотки крови (содержание общего белка, активность ферментов печени, уровень кальция, фосфора) с использованием наборов Corneu на биохимическом анализаторе Dialab.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В наших экспериментах по применению иммуностимулятора на основе бактериального липополисахарида в дозах 5 и 10 мкг АДВ/кг живой массы, проведенных на телятах, выявлены существенные положительные сдвиги в Т- и В-системах клеточного иммунитета, иммунных комплексах, белковых фракциях, обусловленные действием иммуностимулирующего

препарата. Исходя из статистического анализа полученных опытных данных, установлено, что применение препарата в дозе 10 мкг АДВ/кг живой массы один раз в день в течение трех дней подряд наиболее полно и быстрее нормализует иммунитет у телят. Так, во второй опытной группе телят, где применяли препарат в дозе 10 мкг АДВ /кг живой массы, количество розеткообразующих Т-лимфоцитов достоверно увеличилось на 19,41% и В-лимфоцитов – на 50,89%, моноцитов – в 2 раза) и макрофагов в 1,4 раза, тогда как в первой опытной группе достоверных изменений не отмечено. Установлено, что после применения иммуностимулятора происходит снижение алергизации организма животного – нормализуется уровень лейкоцитов и уменьшается количество циркулирующих иммунных комплексов и преобладают средние иммунные комплексы, которые быстро элиминируются организмом, причем данные процессы наиболее выражены во второй опытной группе телят.

При изучении динамики белка и белковых фракций на фоне применения иммуностимулирующего препарата было также выявлено их достоверное, по сравнению с контролем, увеличение. Так, в течение первой недели после применения препарата количество общего белка увеличилось на 27,72% в первой опытной группе и на 31,53% – во второй опытной группе телят.

Установлено повышение содержания иммуноглобулинов на 21,23% и белков системы комплемента C_3 на 36,04% в первой опытной группе на 14 день исследования, тогда как во второй опытной группе эти показатели составляли 32,65% и 63,86% соответственно уже на 7-й день после применения иммуностимулятора, что говорит о более быстром и эффективном иммуногенном действии препарата в дозе 10 мкг/кг. Быстрая активизация белков системы комплемента C_3 является важным показателем в повышении гуморального иммунитета, так как продукция иммуноглобулинов обеспечивается кооперативным взаимодействием В-лимфоцитов при непосредственном участии C_3 комплемента.

Применение иммуностимулирующего препарата в дозе 10 мкг АДВ/кг живой массы способствовало эффективному снижению уровня белков воспалительной фазы – α_2 -глобулинов (церулоплазмин) и α_1 -глобулинов по сравнению с контролем и группой телят, которым препарат применяли в дозе 5 мкг АДВ/кг живой массы. Снижение уровня белков данной фракции указывает на затухание воспалительных процессов и улучшение состояния животных.

Исходя из результатов биохимических исследований, иммуностимулирующий препарат в дозе 10 мкг АДВ/кг живой массы оказал более выраженное воздействие на обменные процессы. Так, через 14 дней после введения препарата соотношение кальций/фосфор составляло в контрольной группе животных 1,10, что свидетельствует о нарушении минерального обмена. Данный показатель в первой и второй опытных группах составил 1,23 и 1,44 соответственно. В дальнейшем во второй группе, где применяли иммуностимулирующий препарат в дозе 10 мкг АДВ/кг живой массы, содержание кальция и фосфора на 30-й день исследования находилось в пределах физиологической нормы, что указывает на нормализацию обменных про-

цессов и превосходит в эффективности применение препарата в дозе 5мкг/кг.

Понижение активности печеночных аминотрансфераз, а именно аламинаминотрансферазы, наиболее выражено во второй опытной группе и говорит о нормализации обменных процессов в печени и устранении дефицита белка.

Таким образом, иммуностимулирующий препарат на основе бактериального липополисахарида в дозе 10 мкг АДВ/кг живой массы 1 раз в день 3 дня подряд позволил активизировать клеточное и гуморальное звенья иммунитета, нормализовать обменные процессы, что благоприятно отразилось на иммунном статусе и клиническом состоянии опытных животных.

Испытания по отработке оптимальной профилактической дозы препарата при вирусных пневмоэнтеритах телят проводились в диапазоне от 5мкг АДВ /кг живой массы до 10мкг АДВ/кг живой массы. Препарат в данных дозах вводили внутримышечно один раз в сутки в течение трех дней подряд.

Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Изучение превентивной активности иммуностимулирующего препарата при вирусных пневмоэнтеритах телят

Препарат	Кол-во телят в группе	Выжило	Пало	% павших телят (LD)
контроль	10	4	6	60,0
препарат в дозе 5 мкг АДВ /кг живой массы	10	6	4	40,0
препарат в дозе 10 мкг АДВ /кг живой массы	10	8	2	20,0

Полученные экспериментальные результаты свидетельствуют о том, что препарат в дозах 5 мкг АДВ /кг живой массы и 10 мкг АДВ/кг живой массы обладает профилактической эффективностью при вирусных пневмоэнтеритах телят и снижает смертность телят на 60 и 80%. Наиболее

эффективной дозировкой при этом является 10 мкг АДВ/кг живой массы.

Оптимальной профилактической дозой иммуностимулирующего препарата при вирусных пневмоэнтеритах телят является 10 мкг АДВ/кг живой массы 1 раз в день 3 дня подряд с эффективностью 80,0%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммуностимулирующий препарат на основе липополисахаридов бактерий *Bac. subtilis* обладает высокой иммуностимулирующей активностью у телят 3–4-х месячного возраста, способствуя достоверному увеличению Т-лимфоцитов на 19,41% и В-лимфоцитов – на 50,89%, моноцитов в 2 раза, макрофагов в – 1,4 раза, а также повышению содержания иммуноглобулинов на 21,23–32,65% и белков системы комплемента С₃ – на 36,04–63,86%.

Разработанный препарат обладает профилактической эффективностью при вирусных пневмоэнтеритах телят, повышая сохранность животных на 60–80%.

Наиболее эффективной терапевтической дозой нового иммуностимулятора на основе бактериального липополисахарида является применение его внутримышечно в дозе 10 мкг АДВ/кг живой массы 1 раз в день 3 дня подряд.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Иммуитет и его коррекция в ветеринарной медицине / П.А. Красочко [и др.]; под общей ред. П.А. Красочко. – Смоленск, 2001. – С. 31 – 32.
- 2 Иммунокоррекция в клинической ветеринарной медицине / П.А. Красочко [и др.]; под ред. П.А. Красочко. – Минск: Техноперспектива, 2008. – С. 31–32.
- 3 Машковский, М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. – Минск: «Беларусь», 1987. – С. 33 – 34.
- 4 Мозгов, И.Е. Фармакология / И.Е. Мозгов. – Москва: «Колос», 1969. – С. 200.
- 5 Современные лекарственные средства фармакокоррекции и химиопрофилактики животных. Научно-практическое издание научно-производственной фирмы «Бровафарма». – Киев, 2007. – С. 113–121.

УДК 619:616.98:579.842.1:615.371:636.2.053

**ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ ИСПЫТАНИЯ
АССОЦИИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ КОЛИБАКТЕРИОЗА
И КЛЕБСИЕЛЛЕЗА ТЕЛЯТ**

Ю.В. ЛОМАКО¹, П.П. КРАСОЧКО², Я.П. ЯРОМЧИК², Л.А. АМОСОВА¹

¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии
им. С.Н. Вышеслесского», г. Минск, РБ

²УО «Витебская ордена «Знак Почёта» государственная
академия ветеринарной медицины», г. Витебск, РБ

Поступила в редакцию 10.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

В современных условиях ведения животноводства острые желудочно-кишечные патологии у новорожденных телят имеют наибольшее распространение среди болезней молодняка первых дней жизни [1, 2].

Анализ данных статистики и результаты исследователей нашей республики и стран зарубежья показывает, что колибактериоз устойчиво занимает первое место по количеству неблагополучных пунктов, количеству заболевших и павших животных. При проведении бактериологических исследований наряду с энтеропатогенными штаммами *E.coli* выделяют клебсиеллы, которые способны обмениваться плазмидами с эшерихиями, передавая свойства антибиотикорезистентности и дополнительных факторов патогенности [1, 2, 3].

Течение колибактериоза в ассоциации с клебсиеллезом затрудняет лечение и характеризуется высоким процентом летальности. При ошибках в выборе терапевтических средств и неправильных подходах терапии падеж заболевших достигает 100% [2, 3].

Специфическая профилактика остается основным методом борьбы с инфекционными болезнями молодняка сельскохозяйственных животных. Сегодня вакцинация против колибактериоза и клебсиеллеза включена во все профилактические схемы, утвержденные на уровне хозяйств и районов республики. Она заключается в проведении иммунизации стельных коров и своевременной выпойке новорожденным телятам молозива с целью создания колострального иммунитета, который позволяет снизить заболеваемость и падеж телят [1, 4].

На рынке ветеринарных услуг имеется достаточно большой выбор вакцин против колибактериоза и клебсиеллеза, изготовленных как в нашей стране, так и за рубежом. Актуальным является производство ассоциированных вакцин, что позволяет снизить трудовые затраты на проведение вакцинаций [1, 4, 5].

Разработанная научными сотрудниками РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им С.Н. Вышеслесского» и УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» ассоци-

ированная вакцина против колибактериоза и клебсиеллеза крупного рогатого скота успешно применяется в условиях животноводческих хозяйств Республики Беларусь.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На основании предыдущих исследований по определению оптимальной дозы и соотношения монокомпонентов нами сконструирован образец вакцины для профилактики колибактериоза и клебсиеллеза телят со следующим содержанием антигенов (микробных тел) в см³: *E. coli* A20 – 0,7 млрд., *E. coli* F41 – 1,0 млрд., *E. coli* K88 – 1,0 млрд., *E. coli* K99 – 1,5 млрд., *Kl. pneumoniae* – 0,8 млрд.

Производственные испытания образца проведены в условиях ОАО «Почепово» Пинского района Брестской области. Для этого было сформировано две группы стельных коров за 2–3 месяца до отела по 50 голов в группе. Коров опытной группы вакцинировали ассоциированной вакциной против колибактериоза и клебсиеллеза двукратно с интервалом 21–28 дней.

Коровы контрольной группы обрабатывались вакциной ОКЗ производства фирмы «Агровет» (РФ, г. Москва), применяемой ранее в хозяйстве.

Новорожденным телятам выпаивали молозиво от коров-рожениц в течение первых 2-х часов после рождения.

За вакцинированными животными и полученным молодняком было установлено наблюдение, показателем эффективности вакцины служила заболеваемость новорожденных телят энтеритами.

Проводили учет реакции на месте введения вакцины, общего состояния животных после иммунизации, показателей поедаемости кормов и молочной продуктивности.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате проведенных испытаний установлено, что ассоциированная вакцина против колибактериоза и клебсиеллеза телят не вызывала воспалительных реакций в месте введения, а также изменений общего состояния организма животных. После вакцинации коровы также охотно поедали корм и принимали воду. Молочная продуктивность на протяжении всего периода исследований находилась без изменений.

Вакцина индуцировала синтез специфических антител, которые в достаточном количестве колюстральным путем передались в организм телят (таблицы 1, 2). По результатам постановки РА в сыворотке крови телят на 5 день жизни имелся довольно высокий уровень агглютининов, способных предотвращать заражение возбудителями желудочно-кишечных инфекций.

Таблица 1 – Титр антител в сыворотке крови стельных коров на 21-е сутки после применения вакцины инактивированной для профилактики колибактериоза и клебсиеллеза телят, $\log_2$

Антигены	Опытная группа	Контрольная группа
<i>E. coli</i> A20	7,9±0,7	4,9±1,3
<i>E. coli</i> F41	8,6±1,2	4,7±0,9
<i>E. coli</i> K99	8,0±1,3	4,1±1,8
<i>E. coli</i> K88	9,3±1,7	3,3±1,8
<i>Kl. pneumoniae</i>	7,9±0,8	3,8±0,9

Таблица 2 – Титры колостральных антител в сыворотке крови новорожденных 5-тидневных телят опытной группы, $\log_2$

Опытная группа	Титры антител против антигенных компонентов вакцины, $\log_2$				
	<i>E. coli</i> A20	<i>E. coli</i> F 41	<i>E. coli</i> K88	<i>E. coli</i> K99	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	10,0±0,57	8,0±0,43	7,9±0,79	5,0±0,34	5,0±0,32

Таблица 3 – Результаты изучения эффективности инактивированной вакцины против колибактериоза и клебсиеллеза телят в ОАО «Почепово»

№№ п/п	Наименование показателей	Единицы измерения	Опытная группа	Контрольная группа
1	количество телят в группе	голов	50	50
2	продолжительность опыта	дней	90	90
3	получено телят	голов	50	50
4	заболело телят с признаками гастроэнтерита	голов	5	12
		процент	10	24
5	из них пало	голов	0	0
		процент	0	0
6	профилактическая эффективность вакцины	процент	90	76

При анализе полученных результатов по эффективности профилактики желудочно-кишечных инфекций телят с помощью вакцины инактивированной эмульгированной для профилактики колибактериоза и клебсиеллеза телят (таблица 3) установлено, что профилактическая эффективность образцов вакцины на 14% выше по сравнению с контролем. Профилактическая эффективность разработанного биопрепарата для специфической профилактики составила 90%.

После завершения исследований составлены соответствующие акты производственных испытаний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный биопрепарат «Ассоциированная вакцина против колибактериоза и клебсиеллеза телят», предназначенный для специфической профилактики указанных болезней новорожденных телят, обладает высокой профилактической эффективностью, которая составляет не менее 90%, не вызывает осложнений, способствует сохранности животных.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Бактериальные и вирусные болезни сельскохозяйственных животных / В.Н. Куриленко, В.А. Крупальник, Н.В. Пименов. – Москва : Колос С, –2006. – 296 с.
- 2 Борисовец, Д. С. Факторы патогенности бактерий рода *Klebsiella* и патогенез клебсиеллеза у сельскохозяйственных животных / Д. С. Борисовец // *Экология и животный мир*. – Минск. – 2009. – № 1. – С.4–10.
- 3 Ломако, Ю.В. Биологические свойства адгезивных штаммов эшерихий / Ю.В. Ломако // *Исследования молодых ученых в решении проблем животноводства : материалы II Международной научно-практической конференции молодых ученых и преподавателей сельскохозяйственных учебных заведений и научно-исследовательских учреждений (г. Витебск, 22 мая 2002 г.)* – Витебск, 2002. – С.158–159.
- 4 Опарина, И. В. Определение иммунизирующей дозы вакцины инактивированной эмульгированной для профилактики колибактериоза, сальмонеллеза, клебсиеллеза и протейоза крупного рогатого скота / И. В. Опарина, Ю. В. Ломако, В. К. Карпович // *Эпизоотология, иммунология, фармакология и санитария*. – Минск. – 2013. – № 1. – С.23–27.
- 5 Эффективность применения отечественной вакцины (КСКП) для профилактики колибактериоза, сальмонеллеза, клебсиеллеза и протейоза крупного рогатого скота / Ю. В. Ломако [и др.] // *Основные направления развития ветеринарной науки*. – Минск. –2013. – С.193–198.

УДК 576.5:616 (021)

**БАРЬЕРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ
ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА ПРИ
ГАСТРОЭНТЕРАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ У ТЕЛЯТ**

В.В. МАЛАШКО, АЛИ ОМАР ХУССЕЙН АЛИ,
А.В. БАШУРА, В.Т. БОЗЕР

*УО «Гродненский государственный аграрный университет»
г. Гродно, РБ*

Поступила в редакцию 28.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Современные знания в биологии позволили понять структурно-функциональную организацию специализированных клеток и приблизиться к пониманию и расшифровке болезней пищеварительных органов, сердца, эндокринных желез, легких, почек, мозга и т.д. [В.Т. Ивашкин и др., 1990]. Защитный барьер слизистой оболочки пищеварительного тракта представляет динамическую систему, оптимальная деятельность которой определяется состоянием микроциркуляции, уровнем активности многих метаболических систем клеток покровно-эпителиального пласта. Сейчас становится более ясным значение слизи как субстанции, непосредственно прилегающее к эпителию слизистой оболочки, в которой могут смешиваться НСІ из полости желудка и щелочные компоненты секрета эпителиоцитов. Исследования последних лет позволили создать концепцию слизисто-бикарбонатного барьера слизистой оболочки [A. Allen et al., 2006].

Механизмы защиты желудочно-кишечного тракта можно условно разделить на неиммунологические и иммунологические [А.В. Кононов и др., 1988]. В процессе онтогенеза сформировалась система защиты, способная нейтрализовать патогенные агенты. В систему неспецифической защиты пищеварительного тракта можно отнести: гликокаликс, межэпителиальные лейкоциты, фагоцитоз, систему комплемента, лизоцим, интерферон, трансферрин, обладающие бактерицидным действием, которые находятся в слюне, желудочном, панкреатическом кишечном соке, способствуют поддержанию нормальной бактериальной флоры и физиологии пищеварения [Л.И. Аруин и др., 1998].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментально-морфологическое исследование проведено на телятах 1–60-дневного возраста. Для проведения комплексных гистологических и ультраструктурных исследований были использованы сычуги и тонкий кишечник от 14 телят, больных абомазоэнтеральной патологией. В качестве контроля служили указанные органы от 8 интактных телят. Для проведения исследований использовали пилорические и фундальные зоны сычуга, образцы ткани тонкого кишечника исследовались на участках соответ-

ствующих 1–1,3% (двенадцатиперстная кишка), 6–7,5% (проксимальный отдел тонкой кишки), 38% (средний участок тонкой кишки), 60–70% (дистальный участок тонкой кишки) и 95–100% (подвздошной кишки) длине тонкого кишечника.

Для изучения структурно-функциональных изменений применяли классические гистологические методики (гематоксилин-эозин), метод Гомори (выявление кислой и щелочной фосфатазы), метод Нахласа (выявление сукцинатдегидрогеназы), метод Браше (выявление РНК), метод Ниссля (нуклеопротеиды), методы Бильшовского-Гросс и Рассказовой (импрегнация серебром). Для проведения электронно-микроскопического исследования использовали микроскопы JEM-100CX (Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Реальные функции пищеварительного аппарата являются результатом хорошо координированных и взаимосвязанных реакций органов [О.Р. Фейтельберг, 1976]. Изменение условий кормления, например, качественного состава рациона, патологические процессы приводят к функциональным перестройкам в работе алиментарной системы. При абомазоэнтеральной патологии нарушаются как неиммунные, так и иммунологические механизмы защиты желудочно-кишечного тракта, что, в свою очередь, предопределяет возникновение заболеваний, тяжесть клинических проявлений и возможность развития отклонений. Лимфоидно-плазматическую инфильтрацию слизистой сычуга и тонкого кишечника телят мы рассматриваем как выражение иммунного воспаления. Число межэпителиальных лимфоцитов в фундальной части сычуга увеличилось в 2,7 раза, в пилорической части – в 1,2 раза, в тонком кишечнике, в среднем, – на 33,4–88,7% ($P < 0,05$) по отношению к контролю.

При воспалительных процессах установлено снижение показателей специфической защиты (снижение титра комплемента и лизоцима, фагоцитарной активности микро- и макрофагов), соответствующие сдвиги в иммунной системе (уменьшение содержания Т-лимфоцитов и Т-хелперов). Указанные иммунные процессы приводят к повышению проницаемости слизисто-клеточного и неклеточного барьеров. Повышение проницаемости защитных барьеров способствует поступлению в организм белковых молекул и полипептидов (так называемых средних молекул), несущих антигенную структуру. Циркуляция их в крови телят вызывает различные иммунологические реакции, в том числе и аллергические.

Слизистую оболочку покрывает непрерывный гидратированный слой. Пристеночный слой выполняет протекторную (механическую, химическую), буферную, пищеварительную и транспортную функции [И.А. Морозов и др., 1988]. В условиях патологического процесса гликокаликсный слой теряет толщину и местами у верхушек микроворсинок фрагментирован. Это позволяет микробам фиксироваться на верхнем ярусе эпителиальных клеток. Начало структурных изменений взаимодействующей системы (слизистая оболочка – микробы) обнаруживается в виде реакции гликокаликса в зоне сближения с микроорганизмами. Когда расстояние между поверхностями клеток не превышает 500 нм, наблюдается растяжение нитей

гликозаминогликанов и формируются мостики микромицеллами гликокаликса и микробами длиной до 205–280 нм, что в своем роде выполняет защитную функцию, препятствующие их проникновению в зону пристеночного пищеварения.

В ответ на развитие воспаления происходит возникновение компенсаторной гиперсекреции, что выражается в усилении функционирования железистого аппарата сычуга и способствует нарушению функционального состояния как париетальных, так муцинообразующих клеток. В итоге формируется стойкий гиперацидный синдром. Особенно этот процесс прогрессирует при развитии диффузного воспаления слизистой оболочки сычуга и двенадцатиперстной кишки.

В первые дни развития воспалительного процесса, как проявление компенсаторно-защитной реакции, наблюдается увеличение темпов пролиферации клеток, а гиперплазия фундальных желез обусловлена увеличением числа добавочных клеток. Увеличение скорости пролиферации клеток, очевидно, способствует повышению резистентности слизистой оболочки сычуга к кислотно-пептидному фактору. По мере развития гиперацидного состояния в межклеточных пространствах формируются аморфные массы, наблюдается микровезикуляция мембран, их разрушение и появление крупных пузырьков. Под влиянием соляной кислоты происходит лизис демосом и вакуолизация периферии цитоплазм клеток. Это сопровождается повышенной элиминацией клеток в полость сычуга и тонкого кишечника. Подсчет апоптотических телец позволил рассчитать апоптический индекс. Апоптический индекс для эпителиальных клеток сычуга в норме составлял $12,43 \pm 1,84$, при патологии – $19,48 \pm 2,81$, в двенадцатиперстной кишке – $16,47 \pm 1,76$ и $22,08 \pm 2,12$ соответственно.

При патологическом процессе как в сычуге, так и в тонком кишечнике животных под эпителиальным слоем формируется большое скопление коллагена толщиной более 10 мкм, в норме толщина не превышала 0,3–3,6 мкм. В основе повышенной коллагенизации, возможно, лежит неспецифическое воспаление и повышенный синтез тропоколлагена фибробластами. Глубокие слои слизистой оболочки инфильтрированы тучными клетками, которые могут стимулировать также развитие фиброза мышечной пластинки слизистой оболочки. В результате коллагенизации слизистой оболочки нарушаются процессы переноса воды через стенку кишки, что приводит к развитию диареи.

Мембранное пищеварение является основным механизмом промежуточных и заключительных стадий гидролиза веществ, обеспечивает сопряжение процессов пищеварения и всасывания. Патология мембранного пищеварения при желудочно-кишечных заболеваниях становится предметом многих исследований, потому что у новорожденных млекопитающих в период лактотрофного питания, когда гидролиз в полости желудочно-кишечного тракта и секреторная функция пищеварительных желез развиты слабо, мембранное пищеварение доминирует [С.А. Ширяев, 1983]. С этих позиций актуальным является гистохимическое определение активности щелочной фосфатазы, которая отщепляет фосфаты от моноэфиров фосфорной кислоты, принадлежащих к разнообразным группам органических соеди-

нений. Высвобождающийся фосфат используется в кишечнике для фосфорилирования углеводов и жиров. Высокая активность щелочной фосфатазы отмечается в структурах слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки, так, если ферментативную активность в среднем принять за 100%, то у здоровых телят она составляет 68,4% у больных телят простой диспепсией – 54,5% и токсической диспепсией – 47,9%. В тонком кишечнике телят наблюдается проксимально-дистальный градиент активности щелочной фосфатазы, который наиболее отчетливо выражен у здоровых телят. Установлено значительное снижение активности щелочной фосфатазы у телят, больных простой и токсической диспепсией, по всей длине кишечника. В тонкой кишке активность щелочной фосфатазы у телят, больных простой диспепсией, ниже в 2,1 раза, а у больных токсической диспепсией – в 3,3 раза. Заболевание пищеварительной системы приводит к развитию дисбактериоза [А.И. Парфенов, 2002]. Благодаря адгезивным свойствам, часть микробов плотно связана с внутренней поверхностью кишечника и составляет примерно 10^{11} кл/г ткани. При бактериальном обсеменении тонкой кишки происходит преждевременная деконъюгация первичных желчных кислот. Образующиеся при этом вторичные желчные кислоты и их соли вызывают диарею и в большом количестве теряются с калом. Бактериальные токсины, протеазы, другие метаболиты, например, фенолы, биогенные амины, бактерии могут связывать V_{12} . Избыточная микробная флора приводит к повреждению эпителия тонкой кишки, так как метаболиты некоторых микроорганизмов обладают цитотоксическим действием. Установлено, что высота ворсинок в двенадцатиперстной кишке при дисбактериозе уменьшается в среднем на 18,4–27,3%, в тонкой кишке – на 38,4–47,8% и в подвздошной кишке – на 12,4–20,2% ($P < 0,05$). Электронно-микроскопические исследования показали, что в подобной ситуации наступает дегенерация микроворсинок, митохондрий и эндоплазматической сети энтероцитов.

При развитии патологического процесса в двенадцатиперстной кишке (дуоденит) отмечается инфильтрация слизистой оболочки, дистрофические изменения энтероцитов, уменьшение количества бокаловидных энтероцитов. Митотическая активность эпителия заметно возрастает, что ведет к появлению на ворсинках не полностью дифференцированного эпителия. У некоторых телят-гипотрофиков мы не обнаружили в инфильтрате плазматических клеток, что является свидетельством отсутствия иммуноглобулинов ткани.

В последние годы был поставлен вопрос об изменении длины микроворсинок в процессе всасывания и развития патологических процессов. Ранее, когда роль микроворсинок сводили лишь к увеличению всасывающей поверхности кишки, их считали относительно стабильными образованиями. Однако проведенные исследования в последнее время показали, что в состав микроворсинок входит сложный комплекс сократительных филаментов. На основании этого был сделан вывод о том, что микроворсинки являются динамичной структурой. Нами отмечено, что длина микроворсинок всасывающих клеток тонкой кишки, располагающихся в различных участках ворсинки и разных отделах кишечной трубки, неодинаковая. Толщина микровор-

синок была, примерно, постоянная в пределах $0,129 \pm 0,005$ мкм, несколько больше у энтероцитов крипт – $0,152 \pm 0,009$ мкм. При выходе на вершину ворсинок отмечалось постоянное уменьшение высоты и количества микроворсинок. В процессе интенсивного всасывания наблюдается укорочение длины микроворсинок, длина уменьшается от середины к вершине ворсинки. При диарейных процессах, разброс по длине микроворсинок заметно возрастал. Выявлялись два вида микроворсинок – сильно укороченные и довольно длинные микроворсинки. Вероятно, появление популяции энтероцитов с укороченными микроворсинками обусловлено уменьшением высоты вследствие интенсивного расхода их мембранного потенциала на формирование пиноцитозных и секреторных везикул. Появление энтероцитов с более длинными микроворсинками, очевидно, связано с интенсивной регенерацией и поступлением из нижележащих отделов ворсинки клеток, которые не имели контакта с пищевыми нутриентами. Электронно-микроскопически установлено, что клетки апикального полюса ворсинок в условиях патологии подвержены инволютивным изменениям, что приводит к повышению проницаемости апикальной плазмолеммы. Данные энтероциты подвергаются экструзии путем выклинивания из эпителиального пласта и поступают в просвет кишки, т.е. происходит неполное поглощение питательных веществ организмом телят.

Компенсаторно-приспособительные реакции в пищеварительной системе развиваются не только на организменном, но клеточном уровнях. В условиях патологии наблюдается процесс кооперирования клеток в результате формирования разнообразных межклеточных контактов типа десмосом, щелевых и плотных соединений. Усиление репаративных процессов объясняется так называемой метаболической кооперацией. При кооперации энтероциты получают возможность использовать сообща метаболиты, лучше приспособляться к новым условиям. Благодаря контактам происходит сквозное прохождение макромолекул (молекулярной массой более 7000) из одной клетки в другую. В итоге в мембранной системе клеток инициируется кооперативная структурная перестройка. На формирование сцепленности клеток кишечника сказывается рН среды. Сдвиг рН в кислую сторону в тонкой кишке увеличивает проницаемость для ионов Cl^- , чем для ионов Na^+ . Сцепленность энтероцитов с низким рН возрастает, достигая максимума при $\text{pH} = 3$. Возрастание сцепленности энтероцитов кишечника при пониженном рН имеет значение для защиты слизистой оболочки. Токсины микробов способны вызывать разобщение клеток, что приводит к потере барьерной функции слизистой оболочки и формированию эрозий.

В результате повышения проницаемости слизистой оболочки кишечника токсические вещества проникают в кровь. Снижается всасывание питательных веществ. Возникает «энтеральная недостаточность» или «синдром нарушенного всасывания и пищеварения». Одной из важных проблем ветеринарной медицины является исследование метаболизма микроэлементов. Проведено определение в сыворотке крови телят содержания минеральных веществ с нарушенными функциями пищеварения (таблица 1)

Таблица 1 – Содержание макро- и микроэлементов в сыворотке крови телят

Телята	Содержание микро- и макроэлементов			
	Са, ммоль/л	Р, ммоль/л	Fe, мкмоль/л	Mg, ммоль/л
клинически здоровые	1,98 ± 0,14	1,27 ± 0,10	7,61 ± 1,12	1,34 ± 0,13
больные с нарушением пищеварения	1,05 ± 0,11*	1,02 ± 0,11	4,48 ± 1,01*	0,67±0,06**

Примечание –*p < 0,05; **p < 0,01

Из данных таблицы 1 видно, что у больных телят выявлено достоверное снижение концентрации железа в сыворотке крови на 41,7%, магния – на 50% и кальция – на 47% по отношению к клинически здоровым телятам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основными заболеваниями новорожденных телят являются простая и токсическая диспепсия, абомазоэнтерит. Ими телята заболевают в 44% случаев. В 20% случаев телята, переболевшие в возрасте 2 – 4 дней, заболевают повторно и среди них наблюдают большой отход [Д.Д. Морозов др., 2001; R.L. Baldwin et al., 1980]. Вышеуказанные болезни вызывают определенные структурно-функциональные изменения в алиментарной системе. Проведенные исследования показывают, что абомазоэнтеральная патология вызывает нарушение мембранного пищеварения, повышенную проницаемость слизистой оболочки для токсических веществ и кормовых агентов,

что в итоге приводит к развитию энтеральной недостаточности и дисбактериоза у телят.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Аруин, Л.И. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника /Л.И. Аруин, Л.Л. Капулляр, В.А. Исаков. – М.: Триада – X, 1998. – 496с.
- 2 Ивашкин, В.Т. Теория функциональных блоков и проблемы клинической медицины /В.Т. Ивашкин, Г.А. Минасян, А.М. Уголев. – Л.: Наука, 1990. – 303с.
- 3 Кононов, А.В. Морфогенез хронических воспалительных заболеваний дыхательной и пищеварительной систем: стереотипные иммунологические реакции слизистых оболочек /А.В. Кононов, Г.И. Непомнящих, А.С. Зиновьев // Бюл. Сиб. отд. АМН СССР. –1988. – №7. – С. 75–82.
- 4 Морозов, Д.Д. Применение адсорбентов энтеросгель для терапии больных гастроэнтеритом телят /Д. Д. Морозов, С. С. Абрамов // Ветеринарная медицина Беларуси. – 2001. -№2. – С.31–32.
- 5 Морозов, И.А. Всасывание и секреция в тонкой кишке: субмикроскопические аспекты /И.А. Морозов, Ю.А. Мышков, Б.В. Питран. –М.: Медицина, 1998. – 224с.
- 6 Сакин, М.Р. Иммунные структуры пищеварительной системы /М.Р. Сакин. –М.: Наука, 1987. –227с.
- 7 Парфенов, А.И. Энтерология /А.И. Парфенов. –М.: Триада – X, 2002.– 744с.
- 8 Фейтельберг, Р.О. Всасывание в желудочно–кишечном тракте / Р.О. Фейтельберг. – М.: Медицина, 1976. – 264с.
- 9 Ширяев, С.А. Активность щелочной фосфатазы в тонкой кишке у здоровых и больных диспепсией новорожденных телят /С.А. Ширяев //Ветеринарные и зоотехнические мероприятия в промышленном животноводстве: сб. науч. тр. – Елгава, 1983. – Вып. 204. – С. 45–48.
- 10 Allen, A. Mucus and bicarbonate secretion in the stomach and possible role in mucosal protection /A. Allen, A Garner //Gut. –2006. –Vol. 21. –P. 249–262.
11. Baldwin, R.L. Manipulating metabolic parameters to improve growth rate and milk secretion /R.L. Baldwin, N.E. Smith, J. Taylor //J. Anim. Sci. –1980. –Vol. 51, № 6. – P. 1416–1428.
- 12 Freeman, H.J. Collagenous inflammatory mucosal diseases of the gastrointestinal tract /H.J. Freeman //Can. J. Gastroenterol. –1990. – №4. –P.196 –224.

УДК 619:616. 391-084: 636.2-053

ДИАГНОСТИКА И КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ У БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

С.Н. КУЗЬМЕНКОВА, В.В. КОВЗОВ, Л.В. ВОЛКОВ

*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная
академия ветеринарной медицины» г. Витебск, РБ*

Поступила в редакцию 24.06.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Основным условием эффективного ведения животноводства на промышленной основе является обеспечение высокой продуктивности животных. Высокая продуктивность – это, прежде всего, генетически обусловленная способность организма эффективно трансформировать питательные вещества кормов в элементы тканей и органов, которые используются как продукты животноводства. Эта способность обусловлена интенсивностью течения процессов обмена веществ в организме на всех уровнях – от использования энергии и питательных веществ кормов в желудочно-кишечном тракте до биосинтеза белка, липидов и других питательных веществ [4, 5].

Своевременная диагностика и обеспечение быков-производителей недостающими микроэлементами и витаминами способствуют нормализации их метаболизма, повышению продуктивности животных, сопротивляемости к болезням и неблагоприятным факторам внешней среды [4, 7, 8].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа по изучению состояния витаминно-минерального обмена у быков-производителей в конце зимне-стойлового периода содержания и его коррекции с использованием препаратов «Тривитамин» и «КМП плюс» была проведена в условиях РУСХП «Оршанское племпредприятие» Оршанского района Витебской области, в НИИ прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии и на кафедре нормальной и патологической физиологии животных УО ВГАВМ.

По принципу условных аналогов было сформировано четыре группы животных по 10 голов в каждой. Быки 1 группы служили контролем. Быкам 2 группы внутримышечно вводили препарат «Тривитамин» в дозе 7 см³ на животное на 1, 7 и 14 дни опыта. Быкам 3 группы внутримышечно вводили препарат «КМП плюс» в дозе 10 см³ на животное однократно. Быкам 4 группы вводили оба указанных препарата в тех же дозах.

В 1,0 см³ препарата «Тривитамин» содержится 30000 МЕ витамина А, 40000 МЕ витамина D₃ и 20 мг витамина Е. В 1 см³ ветеринарного препарата «КМП плюс» содержится 20 мг железа, 4,5 мг йода, 0,08 мг марганца, 1,0 мг селена, 2,0 мг цинка, 0,04 мг кобальта.

В качестве объекта исследования использовали быков-производителей. Предметом исследований была кровь, сыворотка крови.

У всех животных было проведено взятие крови для биохимических исследований в начале опыта (до применения препаратов), на 7 и на 14 день. Биохимическое исследование сыворотки крови проводили на приборе EUROlyser с использованием наборов реактивов фирмы Corneu. Обработывали результаты с помощью статистического пакета анализа Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При анализе результатов исследований крови быков-производителей до начала опыта установлено, что по ряду показателей имеются отклонения от нормы.

В 90 % проб крови установлено низкое содержание витаминов А и Е – $0,091 \pm 0,007$ мкг/мл и $0,70 \pm 0,07$ мкг/мл соответственно. Отмечено нарушение баланса кальция и фосфора. При норме 1,2:1 соотношение составило 0,9:1. Это, возможно, является результатом недостаточности витамина D.

У 50 % животных в крови пониженное содержание кобальта. Низкое содержание цинка у 75 % быков, селена – у 90 %. У 17 % быков содержание железа в крови не соответствует норме. Низкое содержание магния в крови отмечено у 58 % животных.

В 100 % проб крови зарегистрирован пониженный уровень гормона щитовидной железы тироксина (T_4) – $4,09 \pm 0,03$ нмоль/л, что является показателем недостаточности йода.

В ходе опыта в показателях крови быков-производителей опытных групп отмечена тенденция к нормализации содержания витаминов и микроэлементов (таблица 1).

Наибольшие изменения в содержании витаминов А и Е в крови отмечены в четвертой и второй группах. На 14 день опыта в четвертой группе увеличение по сравнению с контролем было на 57,1 и 45,1 %, во второй группе – 18,8 и 6,8 % соответственно.

По динамике содержания в крови микроэлементов наиболее заметные изменения наблюдались в третьей и четвертой группах. Так в третьей группе содержание железа на 14 день превышало контроль на 32,7 %, в четвертой – на 45,2 % ($P < 0,001$). Содержание марганца и цинка в крови увеличивалось практически равномерно и на 14 день опыта в третьей группе достоверно превышало показатели контрольной группы на 10,1 и 13,2 % соответственно, в четвертой – на 17,9 и 22,8 % ($P < 0,001$), причем содержание цинка достигло нормативных значений.

Уровень кобальта в крови к концу опыта у быков в третьей группе увеличился по отношению к контрольной группе на 33,4 %, в четвертой же группе этот показатель увеличился к 7 дню на 49,1 % и к концу опыта разница с контролем не изменилась.

Содержание селена в крови быков увеличивалось на протяжении всего опыта, но находилось ниже нормы, только в четвертой группе к концу опыта уровень данного элемента достиг нижней границы нормы, и достоверная разница с контролем составляла 8,1 %.

Таблица 1 – Биохимические показатели крови быков-производителей контрольной и опытных групп ($M \pm m$, P)

Показатели	Норма	Группы быков	Дни исследований		
			1	7	14
витамин А, мкг/мл	0,13–1,8	1	0,103±0,001	0,109±0,001	0,112±0,001
		2	0,109±0,001	0,123±0,0003**	0,133±0,002
		3	0,111±0,0004	0,115±0,001**	0,123±0,008
		4	0,109±0,0003	0,141±0,0002	0,176±0,01***
витамин Е, мкг/мл	1,3–15	1	0,798±0,01	0,791±0,009	0,799±0,008
		2	0,799±0,06	0,812±0,02	0,853±0,02
		3	0,797±0,009	0,799±0,009	0,814±0,02
		4	0,803±0,01	0,897±0,02***	1,160±0,05
железо, мкмоль/л	15,0+37,6	1	16,77±0,72	16,81±1,17	16,92±1,23
		2	16,99±0,1	17,01±0,28	17,92±0,35
		3	17,02±0,8	19,21±0,66	22,45±0,55***
		4	16,37±0,95	22,71±1,80	24,56±0,56
марганец, мкг/л	150–200	1	151,2±3,2	152,15±3,43	154,59±3,97
		2	152,8±3,1	153,47±3,43	162,58±2,19*
		3	150,2±2,3	163,1±3,27***	170,35±2,71
		4	153,4±2,1	174,73±3,16	182,32±4,28***
цинк, мкг/л	3–5	1	2,72±0,02	2,84±0,13	2,81±0,13
		2	2,67±0,04	2,98±0,2***	2,91±0,3
		3	2,86±0,01	3,05±0,23	3,18±0,8***
		4	2,83±0,04	3,26±0,08***	3,45±0,9*
кобальт, мкг/л	30–50	1	26,37±0,18	26,05±1,07	26,42±0,25
		2	27,02±0,57	28,59±1,33***	30,02±1,3
		3	26,23±0,66	33,76±2,54	35,25±2,3
		4	26,57±0,81	38,85±2,22***	39,48±2,12***
селен, мкг/л	80–110	1	75,37±2,3	75,44±2,2	75,29±2,2
		2	75,85±2,6	75,89±2,4	76,08±2,1
		3	76,02±1,9	77,58±2,7	78,96±2,9
		4	75,67±2,1	78,02±2,2	81,4±3,1***

Примечание – 1 – контрольная группа; 2 – группа, обработанная препаратом «Тривитамин»; 3 – группа, обработанная препаратом «КМП плюс»; 4 – группа, обработанная препаратами «Тривитамин» и «КМП плюс»; * критерий достоверности $P < 0,05$; ** критерий достоверности $P < 0,01$; *** критерий достоверности $P < 0,001$

На рисунках 1, 2 и 3 представлены результаты исследований сыворотки крови быков на содержание тироксина (T_4) свободного, трийодтиронина (T_3) свободного и тиреотропного гормона (ТТГ).

В результате исследований установлено, что применение препарата «КМП плюс» оказывало стимулирующее действие на выработку йодсодержащих гормонов щитовидной железы. Наиболее заметное увеличение содержания T_4 в крови наблюдалось в третьей и четвертой группах животных, разница с контролем к концу опыта составляла 22,6 % и 87,2 % соответственно.

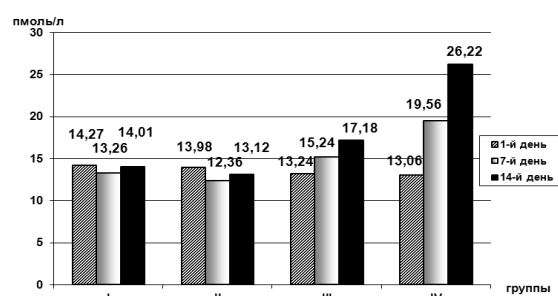


Рисунок 1 – Содержание T_4 свободного в сыворотке крови быков-производителей, пмоль/л

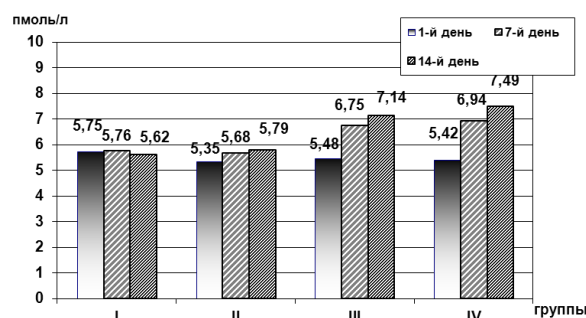


Рисунок 2 – Содержание T_3 свободного в сыворотке крови быков-производителей, пмоль/л

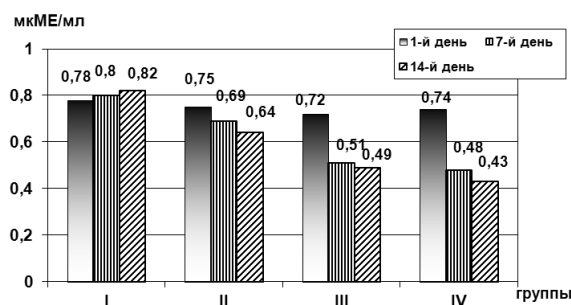


Рисунок 3 – Содержание ТТГ в сыворотке крови быков-производителей, мкМЕ/мл

По данным, представленным на рисунке 2, видно, что содержание T_3 в крови быков повышалось во всех опытных группах, но наиболее заметна была разница с контролем в третьей и четвертой группах. На 7-й день опыта показатели в третьей группе превышали показатели в контрольной на 17 %, в четвертой – на 20,5 %. К концу опыта эти показатели были достоверно выше контроля на 27 и 33 % соответственно.

В динамике содержания тиреотропного гормона наблюдалась тенденция к уменьшению его содержания в сыворотке крови опытных групп животных, в группе контроля показатели практически не изменялись и оставались на достаточно высоком уровне. За все время опыта во второй группе содержание ТТГ снизилось на 14,6 %, в третьей – на 31,9 % и в четвертой группе – на 41,9 %, что, по нашему мнению, является результатом достаточного поступления йода в организм и показателем снижения стимуляции щитовидной железы аденогипофизом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В конце зимне-стойлового периода содержания у быков-производителей наблюдаются субклинические нарушения обменных процессов. Применение быкам-производителям витаминного препарата «Тривитамин» в сочетании с минералосодержащим препаратом «КМП плюс» способствует нормализации витаминно-минерального обмена организма животных и оказывает стимулирующее действие на функцию щитовидной железы.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Дульнев, В. О профилактике нарушений обмена веществ у коров и телят в зимний период / В. Дульнев // Молочное и мясное скотоводство. – 2000. – №1. – С. 20–21.
- 2 Ковалёнок, Ю.К. Микроэлементозы крупного рогатого скота и свиней в Республике Беларусь : монография / Ю.К. Ковалёнок. – Витебск : ВГАВМ, 2013. – 196 с.
- 3 Ковзов, В.В. Пищеварение и обмен веществ у крупного рогатого скота: монография / В.В. Ковзов, С.Л. Борознов. – Минск: Бизнесофсет, 2009. – 316 с.
- 4 Ковзов, В.В. Особенности обмена веществ у высокопродуктивных коров: практическое пособие для ветеринарных врачей, зооинженеров, студентов факультета ветеринарной медицины и слушателей ФПК / В.В. Ковзов. – Витебск: УО ВГАВМ, 2007. – 161 с.
- 5 Кучинский, М. П. Биозлементы – фактор здоровья и продуктивности животных / М. П. Кучинский. – Минск : Бизнесофсет, 2007. – 372 с.
- 6 Микроэлементозы сельскохозяйственных животных: диагностика, лечение и профилактика: справочник / А.П. Курдеко, А.А. Мацинович, Ю.К. Коваленок. — Витебск: УО ВГАВМ, 2005 – 162 с.
- 7 Рекомендации по использованию витаминно-минерально-антиоксидантных премиксов в кормлении быков-производителей : рекомендации / М. М. Карпеня, И. И. Горячев, Н. Г. Корбан. – Витебск: ВГАВМ, 2012. – 19 с.
- 8 Рекомендации по витаминно-минеральному питанию быков-производителей / С. Л. Карпеня, В. И. Шляхтунов, И. И. Горячев, М. М. Карпеня. – Витебск : ВГАВМ, 2009. – 19 с.

УДК 57.088.1

**ЭНДОГЕННЫЙ ВНУТРЕННИЙ КОНТРОЛЬ
ПРИ ИССЛЕДОВАНИЯХ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ
ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**

А.В. БАБИЙ, С.Н. КОВАЛЬЧУК

*ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии и
репродуктивных биотехнологий», Москва, РФ*

Поступила в редакцию 06.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) нашел широкое применение для решения широкого круга научно-исследовательских, а также прикладных задач, таких как генотипирование, диагностика генетических патологий, установление биологического родства, выявление генетического материала и возбудителей инфекционных заболеваний и др. Метод ПЦР отличается высокой чувствительностью и специфичностью, однако для получения с его помощью достоверных результатов необходимо использовать различные виды контролей. Оценка результатов проведенного исследования биологического материала методом ПЦР осуществляют с учетом результатов анализа положительных и отрицательных контролей, а также с учетом внутреннего контроля амплификации

Внутренние контрольные (ВК) образцы бывают двух типов: эндогенные и экзогенные. Экзогенный внутренний образец добавляют к пробе исследуемого биологического материала непосредственно перед началом исследования. Эндогенный внутренний образец изначально присутствует в пробе исследуемого биологического материала. Использование ВК позволяет исключить получение ложноотрицательных результатов исследований вследствие отсутствия или недостаточного для детекции количества ДНК во взятом для анализа образце, неправильного приготовления реакционной смеси, присутствия ингибиторов реакции или ненадлежащего качества используемых реактивов [2].

Нами был разработан набор олигодезоксирибонуклеотидов для амплификации и детекции фрагмента ретротранспозона L1-2_BT, который может быть использован в качестве эндогенного внутреннего контроля при исследованиях биологического материала крупного рогатого скота методом ПЦР реакции в режиме реального времени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Поиск последовательностей L1-2_BT в геноме *Bos taurus* был проведен с использованием сервера <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Анализ последовательностей L1-2_BT и выявление консервативных участков проводили с помощью сервера Clustalw2 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.

Экстракцию ДНК из цельной крови пятнадцати коров калмыцкой, айрширской пород и черно-пестрого голштинизированного скота проводили с использованием набора реагентов Magna™ DNA Prep 200 (ООО «Лаборатория Изоген», Россия) согласно протоколу производителя.

Реакцию амплификации проводили в 20 мкл смеси для ПЦР, содержащей 1×буфер для амплификации, 1 а.е. HS Taq ДНК-полимеразы (ЗАО «Евроген»), 0.2мМ каждого из нуклеозидтрифосфатов, 0.2 мкМ прямого и обратного праймеров, 0.1 мкМ зонда, 2 мкл ДНК. Амплификация проводилась в следующем режиме: первоначальная денатурация при температуре 95 °С в течение 5 мин; 45 циклов амплификации – денатурация при температуре 95 °С в течение 15с, отжиг праймеров при 60 °С в течение 15с, элонгация при температуре 72 °С в течение 15с; заключительная элонгация при температуре 72 °С в течение 5 мин. Результаты ПЦР оценивали методом электрофореза в 2% агарозном геле. Детекцию флуоресценции проводили по каналу ROX на приборе «LightCycler 96» (Roche, Швейцария).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выбор фрагмента ретротранспозона L1-2_BT в качестве эндогенного внутреннего контроля при исследованиях биологического материала КРС методами ПЦР в режиме реального времени обусловлен его видоспецифичностью для КРС [3]. Разработку синтетических олигодезоксирибонуклеотидов для амплификации и детекции фрагмента ретротранспозона L1-2_BT осуществляли на основе последовательности, полученной нами ранее в результате секвенирования фрагментов ДНК коров черно-пестрого голштинизированного скота [1]. С помощью сервера BLAST были найдены участки геномов КРС *Bos taurus* Hereford Btau_4.6.1 и *Bos taurus* UMD 3.1, высоко гомологичные секвенированному нами фрагменту L1-2_BT. С помощью сервера ClustalW2 был проведен анализ полученных последовательностей L1-2_BT и найдены их консервативные участки. Было выбрано три консервативных фрагмента, на основе которых были разработаны праймеры F: 5'-ACTCCCAGCAGAGAACTAGC-3' и R: 5'-AGTCCTTACCCTAAACAATG C-3', и зонд Probe: 5'-ROX-CTCGCGTCCGCCACCAGCAAG-BHQ2.

Апробация олигодезоксирибонуклеотидов была проведена с использованием пятнадцати образцов ДНК трех пород КРС. Разработанные нами праймеры фланкируют участок генома КРС длиной 96 п.н., кодирующий последовательность ретротранспозона L1-2_BT. В результате ПЦР во всех исследованных образцах был обнаружен целевой продукт амплификации длиной 96 п.н. (рисунок 1).

Использование флуоресцентно-меченого зонда позволяет производить детекцию накопления продукта амплификации (эндогенного внутреннего контроля) в режиме реального времени (рисунок 2).

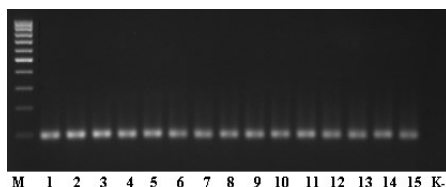


Рисунок 1 – Электрофореграмма амплификации фрагмента ретротранспозона L1-2_ВТ КРС калмыцкой породы (1–5), айрширской породы (6–10) и черно-пестрого голштинизированного скота (11–15). «К-» – отрицательный контроль. М – маркер длин ДНК 100–1000 п.н. (MWM-100RL, Dialat Ltd.)

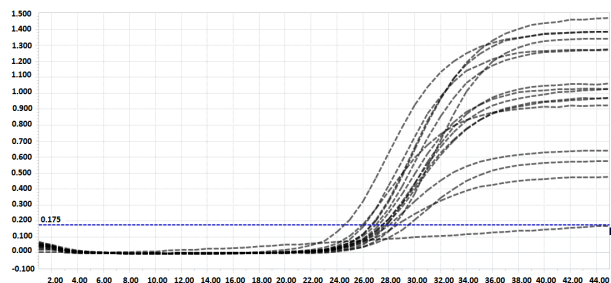


Рисунок 2 – Графики накопления продуктов ПЦР в режиме «реального времени» при анализе образцов геномной ДНК калмыцкой, айрширской пород и черно-пестрого голштинизированного скота. «К-» – отрицательный контроль

Экспоненциальное нарастание флуоресценции наблюдается во всех образцах, что является показателем того, что во всех взятых в анализ образцах прошла амплификация и детекция фрагмента ретротранспозона L1-2_ВТ генома КРС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанные нами праймеры и флуоресцентно-меченый зонд обеспечивают амплификацию и детекцию фрагмента ретротранспозона L1-2_ВТ КРС длиной 96 пар нуклеотидов, который может быть использован в качестве эндогенного внутреннего контроля при исследованиях биологического материала крупного рогатого скота методом ПЦР в режиме реального времени.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Глазко, В.И. Инвертированный повтор микросателлита (AGC)₆G фланкирует районы ДНК с участками гомологии к ретротранспозонам в геноме крупного рогатого скота / В.И. Глазко, Г.Ю. Косовский, С.Н. Ковальчук [и др.] // *Инновационные технологии в медицине*. – 2014. – № 2. – С. 63 – 79.
- 2 Ребриков, Д. В. ПЦР в «реальном времени» / Д. В. Ребриков, Г. А. Саматов, Д. Ю. Трофимов [и др.]. – 2-е изд., испр. и доп. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.
- 3 Jurka, J. L1 family from cow // *Repbase Reports*. – 2009. – Vol. 9. – №2. – P. 598.

УДК: 619:616-07:578.823.91

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ПЦР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ КРС

Ю.И. ТЯПША, О.В. ДУБАНЕВИЧ

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского»,
Минск, РБ*

Поступила в редакцию 15.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Продуктивность животных во многом зависит от их генетического потенциала. Однако высокопродуктивными могут быть только здоровые животные.

Затраты на ветеринарное обеспечение животноводства в нашей стране составляют всего 0,2–0,5% от себестоимости продукции (например, в США – 5–6%). Расчеты ученых показывают, что вложение средств в проведение ветеринарных мероприятий приносит экономический эффект 2,6–9,8 рублей на рубль затрат, а, следовательно, затраты на проведение ветеринарных мероприятий многократно окупаются за счет снижения заболеваемости животных, падежа, затрат на ликвидацию инфекционных болезней, повышения качества животноводческой продукции и т.д. [2, 6, 7, 8, 10]. Сейчас основной экономический ущерб промышленному животноводству наносят не столько особоопасные инфекции (чума, ящур, грипп), сколько экономически значимые рота- коронавирусные инфекции, ИРТ, ВД, парагрипп-3 и др., которые не вызывают массового падежа и гибели животных, но существенно снижают продуктивность. Без борьбы с этими болезнями невозможно выполнение программы по повышению продуктивности сельскохозяйственных животных (увеличению молока и мяса в РБ) [1, 8, 9].

Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) и Международное Эпизоотическое Бюро (МЭБ) в современных рекомендациях по диагностике и профилактике практически всех инфекционных болезней, имеющих особое социально-экономическое значение не только для Республики Беларусь, но и других стран, предусматривают использование методов диагностики, позволяющих в течение 5–8 часов поставить достоверный диагноз. К таким методам относится полимеразная цепная реакция (ПЦР) [3].

Ротавирусная инфекция играет важную роль в развитии нарушений пищеварения у новорожденных телят, что нередко приводит к их гибели и выбраковке. Широкое распространение в хозяйствах Республики Беларусь этой инфекции подтверждается наличием специфических противовирусных антител у животных: по данным Красочко П.П. за 2010–2011 гг. – до 60%. Поэтому знания эпизоотологии инфекционного процесса и актуальные данные по распространению этой болезни позволят контролировать заболеваемость скота и значительно снизить непроизводительное выбытие.

Геном ротавирусов представлен двухцепочечной РНК длиной 18555 нуклеотидов, включающей 11 сегментов (по другим данным 10–12),

заключенных в трехслойный капсид. Каждый сегмент РНК кодирует один белок, исключение составляют гены 9 и 11, которые кодируют по 2 протеина. Наиболее изучены гены VP4 и VP7, что позволяет использовать их для подбора высокоспецифических праймеров. Вместе с тем, ротавирусам крупного рогатого скота присуща значительная вариабельность вирулентности и антигенной специфичности, однако основной структурный белок ротавирусов – протеин внутреннего капсида VP6. С учетом этого, а также того, что в патологии телят большее значение имеют ротавирусы серогруппы А серотипа G6, был проведен подбор соответствующих праймеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На наличие генома вируса ротавирусной инфекции КРС были исследованы штамм вируса ротавирусной инфекции (V - 116) музея коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» и вакцина для профилактики ротавирусной инфекции КРС «Скоугард 4 КС» фирмы Pfizer.

В ПЦР применяли 5х ПЦР буфер для обратной транскриптазы (ГНУ «Институт биоорганической химии НАНБ»), 10х PCR буфер для Taq ДНК-полимеразы, термостабильную ДНК-полимеразу (Taq-полимераза, 5 ед/мкл) (ГНУ «Институт биоорганической химии НАНБ»); рибонуклеазный ингибитор, обратную транскриптазу, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (25 мМ), маркер молекулярного веса «GeneRuler 50 bp Ladder» (Fermentas, Литва); 10х ТЕ-буфер pH 8,0, бромистый этидий (SIGMA, США); агарозу (helicon, Россия); ТАЕ: 0,04М трис ацетат, 0,002М ЭДТА; раствор MgCl₂ (50 мМ); праймеры (F1, R1, зонд); буфер для нанесения проб; стерильную деионизированную воду.

Поиск новых синтетических олигонуклеотидных праймеров осуществляли на основе полных геномов штаммов вируса ротавирусной инфекции КРС по базам данных GeneBank – Национального института здоровья США, EMBL – Европейской молекулярно-биологической лаборатории, DDBJ – Национального института генетики Японии и PDB – базы данных белковых последовательностей при помощи поисковой системы Entrez Национального центра биотехнологической информации США. Полученные последовательности нескольких пар праймеров дополнительно тестировали на специфичность с помощью моделирования ПЦР в программе Vector NTI и BLAST online (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast) с последовательностями геномов вируса вирусной диареи, коронавирусной инфекции, парагриппа-3, ИРТ и бактерий *Manheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*. На заключительном этапе праймеры исследовали по следующим критериям: высокий индекс сходства фрагмента РНК различных штаммов ротавируса, температура отжига 55–60°C, амплифицируемый фрагмент 50–400 п.о. В результате выбраны синтетические олигонуклеотидные праймеры прямой F и обратный R и подобран зонд R. Выбранные праймеры были синтезированы в ОДО «Прайм-тех» (г. Минск). Ориентировочные температуры плавления и отжига праймеров рассчитывали по формуле $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$. Выделение РНК проводили по протоколу «РНК-ВТК».

Реакцию обратной транскрипции для получения к-ДНК проводили следующим образом: в пробирку, содержащую 10 мкл реакционной смеси;

5х ПЦР буфер – 2,7 мкл; RNase ингибитор – 0,17 мкл; dNTPs 25 mM – 0,34 мкл; ревертаза – 0,34 мкл; Primer R – 12 pmol/мкл; H₂O до – 10,0 мкл, добавляли 10,0 мкл РНК-пробы, осторожно перемешивали и инкубировали при температуре 37°C 40 минут, затем при температуре 42°C – 20 минут и при температуре 72°C – 10 минут и использовали для постановки ПЦР.

Амплификация. Использовали оптимальные концентрации компонентов реакционной смеси: ПЦР-буфер АМ – 5,0 мкл; dNTPs 25 mM – 1,0 мкл; MgCl₂ 50 mM – 1 мкл; F праймер R-f – 14 pm; R праймер R-r – 14 pm; таq-полимераза 5 ЕД – 1,0 мкл; буфер для нанесения – 10,0 мкл; H₂O – до 46; к-ДНК – 4 мкл.

С целью отработки оптимального режима амплификации ПЦР рассматривали три различные схемы ее проведения:

1) 1. 94°C 1 мин, 2. 94°C 30 сек; 55°C 30 сек; 72°C 30 сек – 40 циклов, 3. 72°C 6 мин, 4. 10°C хранение.

2) 1. 94°C 1 мин, 2. 94°C 30 сек; 57°C 30 сек; 72°C 30 сек – 40 циклов, 3. 72°C 6 мин, 4. 10°C хранение.

3) 1. 95°C 1 мин, 2. 94°C 30 сек; 60°C 30 сек; 72°C 30 сек – 40 циклов, 3. 72°C 6 мин, 4. 10°C хранение.

Результаты ПЦР регистрировали путем проведения электрофореза в 1,5% агарозном геле в стандартном трис-ЭДТА буфере (pH 8,0) путем внесения 10 мкл продукта ПЦР в лунки агарозного геля. Электрофорез проводили при напряжении 60 В 80 минут. Результаты электрофореза учитывали на приборе Gel Doc XR и с помощью программы ImageLab Software. Результат ПЦР считают положительным, если продукт ПЦР соответствует искомому фрагменту, выраженному в количестве нуклеотидных пар в соответствии с маркером молекулярного веса.

Амплификация в режиме реального времени. Состав реакционной смеси:

- нижняя смесь: ПЦР-буфер АМ – 5,0 мкл; dNTPs 25 mM – 1,0 мкл; MgCl₂ 50 mM – 1 мкл; F праймер R-f – 14 pm; R праймер R-r – 14 pm; H₂O до 35 мкл;

- верхняя смесь: таq-полимераза 5 ЕД – 3,0 мкл; зонд – 2 мкл; к-ДНК – 4 мкл; H₂O – до 15мкл;

Режим амплификации: 1. 94°C 1 мин, 2. 94°C 30 сек; 3. 60°C 30 сек; 4. 72°C 30 сек (п. п. 2–4 – 40 циклов), 5. 72°C 6 мин, 6. 10°C хранение.

Результаты ПЦР в реальном времени учитывали с помощью программы Bio-Rad CFX Manager.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для вируса ротавирусной инфекции рассчитали две пары праймеров комплементарных консервативным участкам VP6 гена, являющимся основным структурным белком внутреннего капсида вируса (таблица 1).

Таблица 1 – Описание гена мишени вируса *Bovine rotavirus*

Название	Bovine rotavirus	
функция	основной структурный белок внутреннего капсида вируса, серогрупповой маркер	
продукт	VP6	
праймер прямой	F VP6 G6	R-f
праймер обратный	R VP6 G6	R-r
последовательность, 5'-3' прямого праймера	TTCAGGTCGCTGGAT-TCGAC	GGGTACGATGTGGCTCAATGC
последовательность, 5'-3' обратного праймера	GGCAAGCACTGATTACAC	CCGCTGGTGTTCATATTTGGTG
температура плавления (Tm), °C прямого праймера	60	66
температура плавления (Tm), °C обратного праймера	60	64
GC, % прямого праймера	55	57.1
GC, % обратного праймера	55	52.4
ампликон, п.о.	449	380

Наиболее оптимальный результат в ПЦР был получен с парой праймеров R-f и R-r и протоколе амплификации 1 – 94°C 1 мин, 2 – 94°C 30 сек, 3 – 60°C 30 сек, 4 – 72°C 30 сек, 5 – п.п.3–5 повтор 40 циклов, 6–72°C 5 мин, 7 – 10°C хранение (рисунок 1).

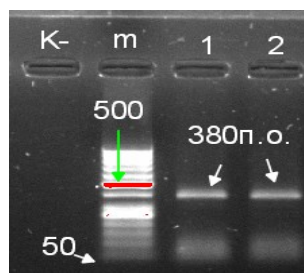


Рисунок 1 – ПЦР продукт, полученный при амплификации к-ДНК из материала, содержащего вирус ротавирусной инфекции КРС

1 – штамм вируса ротавирусной инфекции музея коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского»;

2 – вакцина для профилактики ротавирусной инфекции КРС «Скоугард 4 КС»;

К – отрицательный контроль.

На рисунке представлен электрофорез ампликонов размером 380 п.о., полученных при амплификации генома ПГ-3. Ампликоны размером 380 п.о. видны в виде четкой полосы, диффузные спектры и шмеры отсутствуют.

Перекрестных реакций с к-ДНК вируса вирусной диареи, коронавирусной инфекции, парагриппа-3 и ДНК вируса ИРТ, бактерий *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* не выявлено.

При ПЦР в реальном времени с использованием зонда R и праймеров R-f и R-g наработка специфического продукта наблюдалась с 25 цикла амплификации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальный образец праймеров R-f и R-g и зонд R при режиме амплификации классическим методом и в реальном времени позволяет детектировать наличие в образце к-ДНК вируса ротавирусной инфекции крупного рогатого скота.

Перекрестных реакций с к-ДНК вируса вирусной диареи, коронавирусной инфекции, парагриппа-3 и ДНК ИРТ, *Manheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* не выявлено.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Аавер, Э.А. К эпизоотологии инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в Эстонской ССР: Тез. докл./ Э.А. Аавер [и др.]. – Всесоюзная межвузовская научная конф. по вет. Вирусологии. – 1973. – Ч. II. – С.41–42.
- 2 Андреев, Е.В. Методические рекомендации по диагностике и лечебно-профилактическим мероприятиям при вирусных респираторных заболеваниях крупного рогатого скота /Е.В. Андреев, В.С. Белоконов [и др.]. – Харьков, 1979. – С.1–18.
- 3 Глотов, А.Г. Вирусная диарея – болезнь слизистых оболочек КРС и стратегия борьбы с ней. Обзор/ А.Г. Глотов, К.Л. Келлинг // Российский ветеринарный журнал. – 2007. – №4. – С.19–21.
- 4 Ибрагимов, В.В. Вопрос этиологии энтеритов новорожденных телят/ В.В. Ибрагимов, М.Н. Мусаева // Труды Даг. НИВИ. – Новочеркасск, 1988. – С.97–104.
- 5 Красочко, П.А. Научные основы изучения этиологии, патогенеза и разработка мер борьбы с вирусными инфекциями молодняка крупного рогатого скота/ П.А. Красочко, А.М. Ламан // Эпизоотология, иммунология, фармакология, санитария. – 2006. – №3. – С.3–8.
- 6 Кузьмин, В.А. Инфекционные болезни животных/ В.А. Кузьмин [и др.]. – СПб.: «Лань». – 2007. – С.198–202.
- 7 Лисицын, В.В. Разработка и совершенствование средств специфической профилактики парагриппа-3 крупного рогатого скота/ В.В. Лисицын // Дисс. канд. вет. наук. – 2001, Владимир. – С.129.
- 8 Науменков, В.И. Вопросы этиологии и динамики эпизоотического процесса при вирусных пневмоэнтеритах телят/ В.И. Науменков // «Ветеринария». – №2. – 1994. – С.23.
- 9 Kibenge, F.S.B., Harris, L.M. Amplification of strains of bovine herpesvirus 1 by use of polymerase chain reaction with primers in the thymidine kinase region. *Amjvetres. Schaumburg, Ill.*: American Veterinary Medical Association. Sept 1994. – V.55 (9). – P.1206–1212.
- 10 Larska, M. Application of real time RT-PCR for the detection of type 1 and type 3 of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in biological material/ M. Larska, M.P. Polak. // *Medycyna Wet.* – 2011. – №67(7). – С.483–487.

УДК: 619:616.98:578.833.3:616-079.4

**СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВИРУСА ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ
РЕАКЦИИ С ОДНОВРЕМЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЕЙ
ШТАММОВ ВИРУСА НА 1 И 2 ГЕНОТИП**

О.В. ДУБАНЕВИЧ, Ю.И. ТЯПША

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского»,
Минск, РБ*

Поступила в редакцию 15.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Разработанный в 1983 году Кэри Муллисом метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в настоящее время является распространенным и зачастую незаменимым методом, использующимся в медицинских и биологических исследовательских лабораториях. Полимеразная цепная реакция – это метод биохимической технологии в молекулярной биологии, проводящийся с целью увеличения одной или нескольких копий фрагментов ДНК на несколько степеней, что позволяет создать от нескольких тысяч до миллионов копий определенной последовательности ДНК. Метод основан на термоциклировании, состоящем из повторяющихся циклов нагрева и охлаждения реакции для денатурации и репликации ферментами. Праймеры, содержащие последовательности, комплементарные с целевым участком наряду с ДНК-полимеразой, являются ключевыми компонентами для запуска избирательной и повторной амплификации [8, 9].

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией может быть использована в ветеринарной вирусологии для диагностики вирусной диареи крупного рогатого скота (ВД КРС), а также дифференциации штаммов вируса на генетические группы (генотипы) [5, 6, 7, 8].

Возбудитель ВД КРС относится к роду *Pestivirus* семейства *Flaviviridae* и существует в виде двух биотипов: цитопатогенного и нецитопатогенного. Последний, в отличие от цитопатогенного, не вызывает деструкцию культур клеток.

Вирус проявляет антигенную вариабельность и представлен тремя генотипами: 1, 2 и 3. Генотип 2 объединяет высоковирулентные штаммы, вызывающие острую и сверхострую формы болезни с высокой смертностью, тромбоцитопенией и геморрагиями. Первый генотип вируса распространен повсеместно и вызывает репродуктивные нарушения у коров и быков, желудочно-кишечные и респираторные болезни у телят. Штаммы второго генотипа циркулируют преимущественно в США и Канаде, в Европе, Азии и Южной Америке реже регистрируют случаи вызванной им инфекции. Третий генотип вируса не имеет широкого распространения [1,2,3,4,5].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На наличие генома вируса ВД КРС были исследованы штаммы вируса вирусной диареи тип 1 и 2, принадлежащие РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», вакцина Бови-шилд Голд FP5 фирмы Pfizer, содержащая геномы вируса вирусной диареи тип 1 и 2.

Применяли 5х ПЦР буфер для обратной транскриптазы (ГНУ «Институт биоорганической химии НАНБ»), 10х PCR буфер для Tag ДНК-полимеразы, термостабильную ДНК-полимеразу (Taq-полимераза, 5 ед/мкл) (ГНУ «Институт биоорганической химии НАНБ»); рибонуклеазный ингибитор, обратную транскриптазу, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (25 мМ), маркер молекулярного веса «GeneRuler 50 bp Ladder» (Fermentas, Литва); 10х ТЕ-буфер pH 8,0, бромистый этидий (SIGMA, США); агарозу (helicon, Россия); раствор MgCl₂ (50 мМ); праймеры (F1, F2, R1, зонд); буфер для нанесения проб; стерильную деионизированную воду.

Поиск новых синтетических олигонуклеотидных праймеров осуществляли на основе полных геномов штаммов вируса вирусной диареи КРС по базам данных GeneBank – Национального института здоровья США, EMBL – Европейской молекулярно-биологической лаборатории, DDBJ – Национального института генетики Японии и PDB – базы данных белковых последовательностей при помощи поисковой системы Entrez Национального центра биотехнологической информации США. Полученные последовательности нескольких пар праймеров дополнительно тестировали на специфичность с помощью моделирования ПЦР в программе Vector NTI и BLAST on-line (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast) с последовательностями геномов вируса вирусной диареи, рота и коронавирусной инфекции, ИРТ, бактерий *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*. Окончательный выбор праймеров основывался на следующих критериях: высокий индекс сходства фрагмента РНК различных штаммов вируса вирусной диареи, температура отжига 55–60°C, амплифицируемый фрагмент 50–400 п.о. В результате подобраны синтетические олигонуклеотидные праймеры: прямой F1, F2 и обратный R и подобран зонд VD. Выбранные праймеры были синтезированы в ОДО «Праймтех» (г. Минск). Ориентировочные температуры плавления и отжига праймеров рассчитывали по формуле $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$. Выделение РНК проводили по протоколу «РНК-ВТК».

Для проведения реакции обратной транскрипции для получения к-ДНК в пробирку, содержащую 10 мкл реакционной смеси 5х ПЦР буфер – 2,7 мкл; RNase ингибитор – 0,17 мкл; dNTPs 25 мМ – 0,34 мкл; ревертаза – 0,34 мкл; Primer – 10 pmol; H₂O до – 10,0 мкл, добавляли 10,0 мкл РНК-пробы, осторожно перемешивали и инкубировали при температуре 37°C – 40 минут, затем при температуре 42°C – 20 минут и при температуре 72°C – 10 минут и использовали для постановки ПЦР.

Амплификация. Использовали оптимальные концентрации компонентов реакционной смеси: ПЦР-буфер АМ – 5,0 мкл; dNTPs 25 мМ – 1,0 мкл; MgCl₂ 50 мМ – 1 мкл; F1, F2 и R по 10 pm; taq-полимераза 5 ЕД – 1,0 мкл; буфер для нанесения – 10,0 мкл; H₂O – до 46 мкл; к-ДНК – 4 мкл.

С целью отработки оптимального режима амплификации ПЦР рас-

смаатривали три различные схемы ее проведения:

1) 1. 94°C 1 мин, 2. 94°C 30 сек; 55°C 30 сек; 72°C 30 сек – 40 циклов, 3. 72°C 6 мин, 4. 10°C хранение.

2) 1. 94°C 1 мин, 2. 95°C 30 сек; 56°C 30 сек; 72°C 30 сек – 40 циклов, 3. 72°C 6 мин, 4. 10°C хранение.

3) 1. 94°C 1 мин, 2. 95°C 30 сек; 57°C 30 сек; 72°C 30 сек – 40 циклов, 3. 72°C 6 мин, 4. 10°C хранение.

Результаты ПЦР регистрировали путем проведения электрофореза в 1,5% агарозном геле в стандартном трис-ЭДТА буфере (pH 8,0) путем внесения 10 мкл продукта ПЦР в лунки агарозного геля. Электрофорез проводили при напряжении 60 В 80 минут. Результаты электрофореза учитывали на приборе Gel Doc XR и с помощью программы ImageLab Software. Результат ПЦР считали положительным, если продукт ПЦР соответствует искомому фрагменту, выраженному в количестве нуклеотидных пар в соответствии с маркером молекулярного веса.

Амплификация в режиме реального времени. Состав реакционной смеси:

- нижняя смесь: ПЦР-буфер АМ – 5,0 мкл; dNTPs 25 mM – 1,0 мкл; MgCl₂ 50 mM – 1 мкл; F праймер VD1-F – 10 pm; VD2-F – 10 pm; VD-R – 20 pm; H₂O – до 35 мкл.

- верхняя смесь: таq-полимераза 5 ЕД – 3,0 мкл; зонд – 2 мкл; к-ДНК – 4 мкл. H₂O – до 15мкл.

Режим амплификации: 94°C 1 мин, 2. 94°C 30 сек; 57°C 30 сек; 72°C 30 сек – 40 циклов, 3. 72°C 6 мин, 4. 10°C хранение.

Результаты ПЦР в реальном времени учитывали с помощью программы Bio-Rad CFX Manager.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для вируса вирусной диареи рассчитали две пары праймеров, комплементарных консервативным участкам гена полипротеина, который участвует в синтезе белка (полипротеин) наружной оболочки вируса, отвечающего за специфическое связывание с эукариотическими клетками хозяина (таблица 1).

Таблица 1 – Описание гена мишени вируса вирусной диареи

Название	Вирус вирусной диареи
функция	специфическое связывание с эукариотическими клетками хозяина
продукт	полипротеин
праймер прямой VD1-F	CGACGCCTCGGTATAAAGG
праймер прямой VD2 -F	GACTAGCGGTAGCAGTGAGT
праймер обратный VD-R	CTCCATGTGCCATGTACAG
температура плавления (T _m), °C прямого праймера F1	60
температура плавления (T _m), °C прямого праймера F2	62
температура плавления (T _m), °C обратного праймера R	58
GC, % прямого праймера F1	57
GC, % прямого праймера F2	55
GC, % обратного праймера R	52
ампликон, п.о, VD1	188
ампликон, п.о, VD2	256

Наиболее оптимальный режим амплификации в ПЦР в режиме: 1 – 94°C 1 мин, 2 – 94°C 30 сек, 3 – 57°C 30 сек, 4 – 72°C 30 сек, 5 – п.п.3–5 повтор 40 циклов, 6 – 72°C 5 мин, 7 – 10°C хранение (рисунок 1).

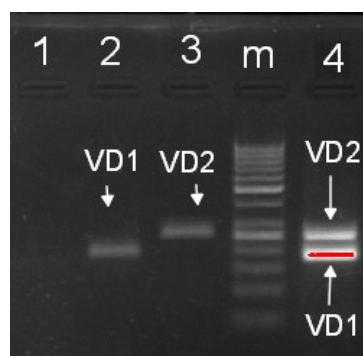


Рисунок 1 – ПЦР продукты, полученные при амплификации к-ДНК из материала, содержащего вирус вирусной диареи КРС в мультиплексной ПЦР

- 1 – отрицательный контроль
- 2 – штамм вируса вирусной диареи, тип1
- 3 – штамм вируса вирусной диареи, тип2
- 4 – вакцина Бови-шилд Голд FP5 фирмы Pfizer

Перекрестных реакций с кДНК вируса вирусной диареи, рота- и коронавирусной инфекции и ДНК вируса ИРТ, бактерий *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* не выявлено.

При ПЦР в реальном времени с использованием зонда VD и праймеров VD1-F, VD2-F наработка специфического продукта наблюдалась с 26 цикла амплификации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальный образец праймеров VD1-F, VD2-F, VD-R и зонда VD при режиме амплификации классическим методом и в реальном времени позволяет детектировать наличие в образце к-ДНК вируса вирусной диареи крупного рогатого скота.

Перекрестных реакций с к-ДНК вирусов парагриппа-3, рота и коронавирусной инфекции и ДНК вируса ИРТ, бактерий *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* не выявлено.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Готов, А.Г. Вирусная диарея – болезнь слизистых оболочек КРС и стратегия борьбы с ней. Обзор / А.Г. Готов, К.Л. Келлинг // Российский ветеринарный журнал. – 2007. – №4. – С. 19–21.
- 2 Готов, А.Г. Вирусная диарея–болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота. / А.Г. Готов // Ветеринария. – 2008. – №6. – С. 56–60.
- 3 Красочко, П.А. Научные основы изучения этиологии, патогенеза и разработка мер борьбы с вирусными инфекциями молодняка крупного рогатого скота. / П.А. Красочко, А.М. Ламан // Эпизоотология иммунология фармакология санитария. – 2006. – №3. – С. 3–8.
- 4 Ernst Peterhans, Claudia Bachofen, Hanspeter Stalder, Matthias Schweizer. Cytopathic bovine viral diarrhea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction // Published online 2010 March 4. doi: 10.1051/vetres/2010016 Vet Res. 2010 Nov-Dec; 41(6): 44. PMID: PMC2850149.
- 5 Larska, M. Application of real time RT-PCR for the detection of type 1 and type 3 of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in biological material / M. Larska, M.P. Polak. // Medycyna Wet. – 2011. – №67(7). – С. 483–487.
- 6 Matthias Schweizer Ernst Peterhans Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus Inhibits Double-Stranded RNA-Induced Apoptosis and Interferon Synthesis // PMID: PMC114223, J Virol. 2001 May; 75(10): 4692–4698., doi: 10.1128/JVI.75.10.4692–4698.2001
- 7 Sharma, A. Development of a multiplex PCR assay for the detection of infectious causes of bovine abortion / A.Sharma, D. Deka, R. Agrawal, N.M. Mitra // Journal of Cell and Tissue Research. – 2013. – №13(3). – С. 3865–3870.
- 8 <http://www.nazdor.ru/topics/improvement/devices/current/466802/>
- 9 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_001461.1

УДК: 619:616.98:578.832.1:615.2

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ВИРУСА ПАРАГРИППА-3

Ю.И. ТЯПША, О.В. ДУБАНЕВИЧ

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского»,
Минск, РБ

Поступила в редакцию 15.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус парагриппа 3 (ПГ-3) относится к семейству *Paramyxoviridae* рода *Paramyxovirus*. Парагриппом чаще болеет молодняк крупного рогатого скота в возрасте 1,5–3 месяцев. Значительный экономический ущерб заболевание наносит крупным фермам, куда поступают телята из хозяйств-поставщиков [1, 2, 3, 4, 5]. У животных старше 6 месяцев клинические проявления заболевания, как правило, не встречаются, как и у взрослых животных, инфекция протекает латентно.

Учитывая низкую чувствительность и специфичность обычных методов прямого выявления вируса ПГ-3, актуальной проблемой является разработка молекулярно-генетических методов его детекции, в частности в полимеразной цепной реакции (ПЦР) [1, 2].

Цель работы – разработка набора реагентов и оптимизация детекции генома вируса ПГ-3 в ПЦР режиме амплификации классическим методом и в реальном времени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве материала, содержащего геном вируса ПГ-3, использовали вакцины «ВГНКИ-4» (ВГНКИ, ФГУ ВНИИЗЖ), «Бови-шилд Голд FP5» (Pfizer), штамм ПГ-3 (коллекция культур микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского»).

При определении специфичности тест-системы использовали штаммы вируса вирусной диареи, ИРТ, рота- и коронавирусной инфекции и бактерий *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*.

Для ПЦР применяли 5х ПЦР буфер для обратной транскриптазы (ГНУ «Институт биоорганической химии НАНБ»), 10х PCR буфер для Tag ДНК-полимеразы, термостабильную ДНК-полимеразу (Taq-полимераза, 5 ед/мкл) (ГНУ «Институт биоорганической химии НАНБ»); рибонуклеазный ингибитор, обратную транскриптазу, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (25 мМ), маркер молекулярного веса «GeneRuler 50 bp Ladder» (Fermentas, Литва); 10х TE-буфер pH 8,0, бромистый этидий (SIGMA, США); агарозу (helicon, Россия); раствор MgCl₂ (50 мМ); праймеры (F1, R1, зонд); буфер для нанесения проб; стерильную деионизированную воду.

Подбор праймеров осуществляли с помощью программы Vector NTI, сравнивая полные геномы штаммов вируса ПГ-3 по базам данных GeneBank–Национального института здоровья США, EMBL – Европейской молекулярно-биологической лаборатории, DDBJ – Национального института генетики

Японии и PDB – базы данных белковых последовательностей при помощи поисковой системы Entrez Национального центра биотехнологической информации США. Полученные последовательности нескольких пар праймеров дополнительно тестировали на специфичность с помощью программы BLAST on-line (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast) с последовательностями геномов вируса вирусной диареи, рота- и коронавирусной инфекции, ИРТ и бактерий *Manheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*. Окончательный выбор праймеров основывался на следующих критериях: высокий индекс сходства фрагмента РНК различных штаммов ПГ-3, температура отжига 55–60°C, амплифицируемый фрагмент 50–400 п.о. В результате выбраны синтетические олигонуклеотидные праймеры: прямой F и обратный R и подобран зонд PIV-3. Выбранные праймеры были синтезированы в ОДО «Праймтех» (г. Минск). Ориентировочные температуры плавления и отжига праймеров рассчитывали по формуле $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$. Выделение РНК проводили по протоколу «РНК-ВТК».

Реакции обратной транскрипции для получения к-ДНК проводили следующим образом: в пробирку, содержащую 10 мкл реакционной смеси 5х ПЦР буфер – 2,7 мкл; RNase ингибитор – 0,17 мкл; dNTPs 25 mM – 0,34 мкл; ревертаза – 0,34 мкл; Primer R – 11 pmol/мкл; H₂O до – 10,0 мкл, добавляли 10,0 мкл РНК-пробы, осторожно перемешивали и инкубировали при температуре 37°C – 40 минут, затем при температуре 42°C – 20 минут и при температуре 72°C – 10 минут и использовали для постановки ПЦР.

Амплификация. Использовали оптимальные концентрации компонентов реакционной смеси: ПЦР-буфер АМ – 5,0 мкл; dNTPs 25 mM – 1,0 мкл; MgCl₂ 50 mM – 1 мкл; F праймер – 12 pm; R праймер – 12 pm; таq-полимераза 5 ЕД – 1,0 мкл; буфер для нанесения – 10,0 мкл; H₂O – до 46; к-ДНК – 4 мкл.

С целью отработки оптимального режима амплификации ПЦР рассматривали три различные схемы ее проведения:

- 1) 1. 94°C 1 мин, 2. 95°C 30 сек; 55°C 30 сек; 72°C 30 сек – 40 циклов, 3. 72°C 6 мин, 4. 10°C хранение.
- 2) 1. 94°C 1 мин, 2. 95°C 30 сек; 57°C 30 сек; 72°C 30 сек – 40 циклов, 3. 72°C 6 мин, 4. 10°C хранение.
- 3) 1. 94°C 1 мин, 2. 95°C 30 сек; 60°C 30 сек; 72°C 30 сек – 40 циклов, 3. 72°C 6 мин, 4. 10°C хранение.

Результаты ПЦР регистрировали в электрофорезе в 1,5% агарозном геле в трис-ЭДТА буфере (рН 8,0) 10 мкл продукта ПЦР при 60 В (80 минут). Результаты электрофореза учитывали на Gel Doc XR с программой ImageLab Software. Результат считали положительным, если продукт ПЦР соответствует искомому фрагменту, выраженному в количестве нуклеотидных пар в соответствии с маркером молекулярного веса.

Амплификация в режиме реального времени. Состав реакционной смеси:

- нижняя смесь: ПЦР-буфер АМ – 5,0 мкл; dNTPs 25 mM – 1,0 мкл; MgCl₂ 50 mM – 1 мкл; F праймер PIV – 12 pm; R праймер PIV – 12 pm; H₂O до 35 мкл.

- верхняя смесь: таq-полимераза 5 ЕД – 3,0 мкл; зонд – 2 мкл; к-ДНК – 4 мкл; H₂O – до 15 мкл.

Режим амплификации: 94°C 1 мин, 2. 94°C 30 сек; 57°C 30 сек; 72°C 30 сек – 40 циклов, 3. 72°C 6 мин, 4. 10°C хранение.

Результаты ПЦР в реальном времени учитывали с помощью программы Bio-Rad CFX Manager.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для ПГ-3 рассчитали две пары праймеров комплиментарных консервативным участкам гена N, кодирующего нуклеопротеид, фланкирующий участок штамма JQ063064, JX969001 и длиной соответственно 486 и 113 п.о. (таблица 1).

Таблица 1 – Описание гена мишени вируса *Bovine parainfluenza virus 3*

Название	Bovine parainfluenza virus 3	
штамм	JQ063064	JX969001
функция	структурная, регуляторная в процессе транскрипции и репликации	
продукт	нуклеопротеин N	
праймер прямой	F 123	F 7-8
праймер обратный	R 123	R 7-8
последовательность, 5'-3' прямого праймера	CAGCCCATGGTTCTCAA ATAGG	GGAGTTATGC- AATGGGTGTAGC
последовательность, 5'-3' обратного праймера	TATGCAGCTG- GAAGTGTCTG	ACGTGCCACTGCTT- GACCT
температура плавления (Tm), °C прямого праймера	66	68
температура плавления (Tm), °C обратного праймера	62	60
GC, % прямого праймера	50	50
GC, % обратного праймера	47,6	57,9
ампликон, п.о.	486	113

Оптимальный результат в ПЦР был получен с парой праймеров F₇₋₈ и R₇₋₈ и протоколе амплификации 1 – 94°C 1 мин, 2 – 94°C 30 сек, 3 – 57°C 30 сек, 4 – 72°C 30 сек, 5 – п.п.3–5 повтор 40 циклов, 6 – 72°C 6 мин, 7 – 10°C хранение (рисунок 1).

1 – штамм ПГ-3 музея отдела молекулярной биологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»;

2 – вакцина «ВГНКИ-4» (ВГНКИ, ФГУ ВНИИЗЖ);

3 – вакцина Бови-шилд Голд FP5 (Pfizer);

4 – отрицательный контроль.

На рисунке представлен электрофорез ампликонов размером 113 bp,

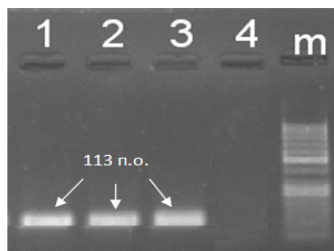


Рисунок 1 – Электрофорез продукта, полученного при амплификации к-ДНК вируса, содержащего вирус парагриппа-3

полученных при амплификации генома ПГ-3. Ампликоны размером 113 бр видны в виде четкой полосы, диффузные спектры и шмеры отсутствуют.

Перекрестных реакций с к-ДНК вируса, вирусной диареи, рота- и коронавирусной инфекции и ДНК вируса ИРТ и бактерий *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* не выявлено.

В ПЦР в режиме реального времени с использованием зонда PIV-3 и праймеров F_7–8 и R_7–8 наработка специфического продукта наблюдалась с 29 цикла амплификации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальный образец праймеров F-7–8 и R-7–8 и зонда при режиме амплификации классическим методом и в реальном времени позволяет детектировать наличие в образце к-ДНК вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота. Перекрестных реакций с к-ДНК вируса вирусной диареи, рота- и коронавирусной инфекции и ДНК вируса ИРТ и бактерий *Manheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* не выявлено.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Бурнадзе, Т.П. Острые респираторные вирусные инфекции крупного рогатого скота в хозяйствах республики Коми и усовершенствование системы противоэпизоотических мероприятий: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук. – Екатеринбург. – 2007– 24 с.
- 2 Думова, В.В. Распространение вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота у жвачных животных / В.В. Думова, В.А. Мищенко, А.В. [и др.] // Ветеринария Кубани. – 2012. – №3 – С. 5–8.
- 3 Красочко, П.А. Научные основы изучения этиологии, патогенеза и разработка мер борьбы с вирусными инфекциями молодняка крупного рогатого скота / П.А. Красочко, А.М. Ламан // Эпизоотология иммунология фармакология санитария. – 2006. – №3. – С.3–8.
- 4 Смирнов, П.Н. Изучение адаптационных возможностей сельскохозяйственных животных в Сибири / П.Н. Смирнов, Г.А. Ноздрин [и др.] // Вирусная диарея болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота: характеристика возбудителя и клинические проявления / А.Г. Готов; под ред. А.Е. Дайнеко. – Новосибирск: Ин-т эксперим-й ветеринарии Сибири и Дальнего востока, 2006. – 105с.
- 5 Федоров, Ю.Н. Факторные болезни: 1 эпизоотология и патология 23 / Ю.Н. Федоров, П. Урбанович, А. Потапенко// Ветеринария. – 1996, № 11. – С. 3–6.

УДК:619:616.98:578.824.11

ДИАГНОСТИКА БЕШЕНСТВА НА ОСНОВЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

В.И. КЛЮКИНА, О.В. АНИСИНА

*ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический
институт биологической промышленности», г. Щелково, РФ*

Поступила в редакцию 10.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Большинство методов, таких как метод флюоресцирующих антител, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция, выделение вируса *in vitro*, рекомендуемых Комитетом экспертов ВОЗ для диагностики бешенства, предназначены, в основном, для постмортальной диагностики и требуют специального оборудования и высокой квалификации исследователей [1, 2, 3].

Эффективность интравитальной индикации вируса бешенства в эпителиальных клетках роговицы глаза, в биоптатах кожи, в слюне, в спинномозговой жидкости рассматривалась лишь в единичных работах [1, 2, 6, 7]. Новые биотехнологические основы конструирования современных тест-систем на основе молекулярной биологии обеспечили в настоящее время разработку и внедрение в практику диагностических экспресс-методов иммунохроматографического анализа [2, 3].

В данной работе представлены результаты оценки метода иммунохроматографического анализа для экспресс-выявления антигена бешенства в образцах ткани мозга и слюны.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для конструирования тест-системы ИХА использовали набор нитроцеллюлозных мембран «Advanced Mikrodetects» (Индия); Protran BA83 «Sigma» (размер пор 0,2–0,45 мкм); нитроцеллюлозные мембраны производства «Millipore» (США), на которые с помощью диспенсера IsoFlow («Image Technology», США) наносили иммуноспецифические и контрольные реагенты. Нитроцеллюлозные мембраны склеивали, нарезали на тест-полоски 0,5х6 см (ИХА-полоски) и хранили в плотно закрытых пластиковых тубах при температуре 4⁰С.

Антиген вируса бешенства выявляли методом иммунохроматографического анализа (ИХА) в образцах ткани мозга мышей, зараженных вирусом бешенства штамм «CVS», баранов, зараженных вирусом бешенства штамм «Овечий», и экспериментальных пробах суспензии вируса бешенства в слюне собаки.

«Сэндвич» вариант ИХА проводили по методу Lembo T., et. al. (2006). Конъюгат антирабических IgG с частицами коллоидного золота готовили по методу G.T. Hermanson (1996). Чувствительность (предел обнару-

жения) ИХА определяли по результатам титрования в тест-системе инфицированной ткани мозга и суспензии вируса бешенства в слюне.

Эффективность ИХА оценивали путем сравнения с результатами выявления антигена вируса бешенства в прямом МФА с помощью «Глобулина флюоресцирующего для диагностики бешенства» ТУ 9388-003-00497963-97.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Ранее нами были разработаны тест-системы dot-ELISA с конъюгатом анти-рибонуклеопротеиновых (РНП) антител с пероксидазой и частицами коллоидного золота и показана возможность выявления антигена вируса бешенства в экспериментальных пробах слюны собак с чувствительностью выявляемого вируса $2,3 \lg LD_{50}/0,03\text{см}^3$ и $2,0 \lg LD_{50}/0,03\text{см}^3$ соответственно [4]. К недостаткам тест-систем можно отнести многокомпонентность и длительность проведения анализа (1–2 часа).

Стратегия сэндвич варианта ИХА предполагает выявление антигена вируса бешенства на нитроцеллюлозной мембране с предварительно фиксированными конъюгатом высокоаффинных антирабических IgG с частицами коллоидного золота (подушка конъюгата), антинуклеокапсидными IgG (тестовая линия) и антивидовыми IgG (контрольная линия). О наличии вируса бешенства в пробе свидетельствовало появление двух окрашенных полос на тестируемой и контрольной линиях. Появление только одной линии в контрольной зоне свидетельствовало об отсутствии вируса бешенства в пробе.

В результате проведенных исследований установлено, что антиген вируса бешенства был обнаружен во всех образцах ткани мозга зараженных мышей и баранов, совпадаемость результатов МФА и ИХА составила 100%. В экспериментальных пробах слюны антиген вируса бешенства был обнаружен у 83,3% (15 из 18) и у 77,7% (7 из 9) образцов.

Показано, что интенсивность окраски тестовой полосы зависит от исследуемых проб и находится в прямой зависимости от концентрации вируса в пробе. Увеличение интенсивности окраски, как правило, совпадало с повышением концентрации искомого вируса в пробе. При нанесении на ИХА полоску инфицированной ткани мозга мышей менее 2,5%, мозга барана – 5%, смеси вирус+слюна в разведении менее 1:64 не приводило к появлению окрашенной полосы в аналитической зоне, что свидетельствует о пределе чувствительности обнаружения вируса бешенства в данных пробах с помощью разработанной нами тест-системы на основе ИХА.

Установлено, что все замороженные образцы и хранившиеся в глицерине (100%) были положительными в тесте ИХА в течение 6 месяцев хранения. Образцы с признаками разложения были пригодны для исследования методом ИХА в течение 48–72 часов хранения, увеличение степени разложения образцов приводило к получению ложноотрицательных результатов ИХА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о принципиальной возможности выявления антигена вируса бешенства «сэндвич» методом ИХА с использованием нитроцеллюлозных мембран с фиксированными иммунореагентами.

Показано, что чувствительность ИХА зависит от концентрации вируса в пробе.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* // OIE Terrestrial Manual, 2008. – Part 2, section 1, chapter 2.1.13. – P. 304–323.
- 2 *Molecular tools for rabies diagnosis in animals* / A.R. Fooks, L.M. McElhinney, D. Horton, [et al.] // *Compendium of the OIE Global Conference on Rabies Control. – 2011 Incheon-Seoul (Republic of Korea).* – P. 75–85.
- 3 Самуйленко, А.Я. *Инфекционная патология животных*/А.Я. Самуйленко, С. А. Гринь, В. И. Еремец, В. И. Клюкина [и др.] // Том II. Бешенство – Москва, ВНИТИБП. –2012.– 153 с.
- 4 *Evaluation of a rapid immunodiagnostic test kit for rabies virus* / B.K. Kang, J.S. Oh, C.S. Lee, [et al.] // *J. Virol. Meth.* – 2007. – Vol. 145. – P.30–36.
- 5 Клюкина, В.И. *Выявление антигена вируса бешенства с использованием иммунохроматографического экспресс-теста*/ В.И. Клюкина, О.В. Анисина // *Ветеринария и кормление.* – 2012. – № 6. – С 23–24.
- 6 Ковалев, Н.А. *Иммунофлуоресцентное исследование отпечатков роговицы при бешенстве* / Н.А. Ковалев, А.С. Шашенько // *Ветеринария.* –1970. – № 9. – С. 44–46.
- 7 Schneider, L.G. *The cornea test: a new method for the intra-vital diagnosis of rabies* / L.G. Schneider // *Zentrabl. Veterinaer. Med.* – 1969. – № 16. – P. 24–31.

УДК 619:616.98:578.824.11:615.371

**ИММУНОПРОФИЛАКТИКА БЕШЕНСТВА В БЕЛАРУСИ –
РАЗРАБОТКА И ПРОИЗВОДСТВО АНТИРАБИЧЕСКИХ ВАКЦИН
(ОБЗОР)**

Н.А. КОВАЛЕВ, П.А. КРАСОЧКО, Д.В. БУЧУКУРИ, М.М. УСЕНЯ

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

Поступила в редакцию 16.10.2015 г.

Одно из ведущих мест в инфекционной патологии занимает бешенство, которое является исключительно опасным, смертельным заболеванием всех теплокровных животных и человека. Заболевание бешенством имеет широкое распространение во многих странах мира, в том числе и Беларуси.

Одной из основных мер борьбы с ним была и остается антирабическая вакцинация. Вакцинопрофилактика имеет вековую историю, начинающуюся от Л. Пастера.

За предыдущие годы появились сотни модификаций живых и инактивированных антирабических вакцин, авторы которых стремились повысить их иммуногенность, безвредность, стабильность, технологичность, дешевизну и другие качества.

В Республике Беларусь антирабические вакцины не производились и их приходилось закупать в других странах. Исходя из этого белорусским институтом экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского были проведены исследования по разработке отечественных антирабических вакцин.

В результате было селекционировано 2 штамма вакцинного вируса бешенства: штамм «71 БелНИИЭВ-ВГНКИ» (авт. св. СССР № 1091393 от 4 ноября 1982 г.) и штамм «КМИЭВ-94» (патент РБ № 13935 от 9 июля 2010). Разработана вакцина антирабическая жидкая культуральная инактивированная сорбированная из штамма «71 БелНИИЭВ-ВГНКИ «Белраб», вакцина антирабическая культуральная лиофилизированная из штамма «71 БелНИИЭВ-ВГНКИ «Рабириф», вакцина для пероральной иммунизации диких плотоядных животных из штаммов вируса «71 БелНИИЭВ-ВГНКИ» и «КМИЭВ-94» (авт. св. СССР №1120701 от 1 декабря 1982 г, патент РБ № 12701 от 10 июля 2009, патент РБ № 13935 от 9 июля 2010г) [1, 3].

Наибольшее применение получили вакцина «БЕЛРАБ» и вакцина для пероральной иммунизации диких плотоядных животных из штамма «КМИЭВ-94», которые производятся в институте экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского и в ОАО «Белвитунифарм» (бывшая Витебская биофабрика), широко применяются в Республике Беларусь и экспортируются в другие страны СНГ [2, 5].

Вакцина «Рабириф» в качестве вирусосодержащего материала включает вакцинный вирус бешенства, штамм «71 БелНИИЭВ-ВГНКИ», в титре 5,5

–6,5 lg ЛД₅₀/мл до инактивации, выращенный в культуре клеток ВНК-21, РС или VERO, в качестве инактиватора вируса – теотропин или димер этиленимин, в качестве адъюванта – гидроксал при следующих соотношениях компонентов (в %): вирусосодержащий материал штамма «71 БелНИИЭВ-ВГНКИ» – 89,07–89,09; гидроксал – 10,0; инактиватор вируса теотропин – 0,15 или димер этиленимин – 0,03. Способ изготовления вакцины антирабической жидкой культуральной сорбированной инаktivированной включает культивирование вируса, его инаktivацию и конструирование вакцины.

Вирус в количестве 0,1–0,2 МИД₅₀/кл вносят одновременно с клетками ВНК-21, РС или VERO в концентрации 0,3–0,5 млн кл/мл или на сформированный монослой и выращивают в стационарных или роллерных условиях в среде Игла при температуре 37°C в течение 4–6 суток. Вирусное сырье инаktivируют теотропином в 0,15 %-ной концентрации в течение 24 ч или димер этиленимином в 0,03 %-ной концентрации в течение 12 ч при температуре 37°C, добавляют гидроксал до конечной концентрации 10 об. % [3].

Разработан также суспензионный способ накопления вирусного штамма «71 БелНИИЭВ-ВГНКИ» для вакцины на клетках ВНК-21, технология которого заключается в следующем: вирус штамма БелНИИЭВ-ВГНКИ вносят в реактор одновременно с клетками ВНК-21 с исходной концентрацией клеток 0,5–0,6 млн. кл/мл и выращивают в суспензии. Культивирование проводят в суспензионной среде ФГМ при температуре 37°C в течение 3–6 суток при постоянном перемешивании и поддержании рН 7,2–7,4.

Хранение при температуре плюс 4–10°C обеспечивает годность вакцины в течение 18 месяцев со дня изготовления.

Вакцина для пероральной иммунизации диких плотоядных животных из штамма вируса бешенства «КМИЭВ -94» включает вирус в титре 6,5–7,5 lg LD₅₀/мл, выращенный в культуре клеток ВНК-21 суспензионным способом. Множественность заражения клеток составляет 0,1–0,5 ТКИД₅₀/кл, посевная концентрация клеток – 500–1000 тыс кл/мл, продолжительность культивирования – 72–96 часов.

Вакциносодержащие приманки включают мясокостную и пшеничную муку, глицерин, желатин, воду и тетрациклин гидрохлорида в определенном соотношении, блистеры для приманок из полипропилена. Вакцину фасуют в блистеры с добавлением в качестве стабилизатора 10–12% глицерина [5].

Разработанные вакциносодержащие антирабические блистерприманки хорошо поедаются плотоядными животными с прокусом блистеров, вызывая положительную сероконверсию и невосприимчивость к бешенству.

Культуральный вирус бешенства штамма «КМИЭВ-94» хорошо сохраняется в блистерприманках не только при минусовых, но и при плюсовых температурах, что свидетельствует о возможности проведения оральной вакцинации диких плотоядных животных в весенне-летнее и осеннее время [5].

Лиофилизированная антирабическая вакцина «Рабириф» содержит рифампицин и предназначена для вынужденных профилактических прививок, но пока широко не применяется.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Широкое применение в Республике Беларусь антирабической вакцинации животных, в том числе с применением отечественных вакцин, в частности, пероральной вакцинации диких плотоядных животных позволило резко снизить заболеваемость последних бешенством с 946 случаев в 2010 г. до 346 случаев в 2012 г..

В дальнейшем маломасштабное производство отечественных антирабических вакцин в ОАО «Белвитунифарм» и опытно-промышленном подразделении института позволит свести количество заболеваний животных бешенством до единичных случаев.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Бучукури, Д.В., Эффективность отечественной антирабической вакцины «Белраб»/ Д.В. Бучукури, Н.А. Ковалев, М.М. Усень // Наше сельское хозяйство. – 2012. – № 15. – С.49–51.
- 2 Ковалев, Н.А. Изучение иммуногенной активности жидкой культуральной инактивированной сорбированной антирабической вакцины/ Н.А. Ковалев, П.И. Уласович, Д.В. Бучукури, М.М. Усень // Ветеринарная наука – производству: Научные труды ИЭВ им. С.Н. Вышеслесского. – Вып. 37. – Мн. 2005. – С.158–163.
- 3 Ковалев, Н.А. Конструирование комбинированной антирабической вакцины «Рабириф» для постэкспозиционной профилактики бешенства животных/ Н.А. Ковалев, П.И. Уласович, М.М. Усень, Н.П. Мишаева // Материалы международной научно-практической конференции «Современные вопросы патологии сельскохозяйственных животных. – Минск, 2003. – С.133–134.
- 4 Ковалев, Н.А., Красочко, П.А. Вирусы и прионы в патологии животных и человека/Н.А. Ковалев, П.А.Красочко // Минск, «Беларусская наука» – 2012. – 426с.
- 5 Ковалев, Н.А. Противозооотическая эффективность вакцины из штамма вируса бешенства КМНЭВ-94 для пероральной иммунизации диких плотоядных животных против бешенства / Н.А. Ковалев, Д.В. Бучукури, М.М. Усень. – Вести национальной академии наук Беларуси. Серия аграрных наук, 2009. – №3. – С.86–91.

УДК 619:616.98:578.827.11:636.2

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ ПАПИЛЛОМАТОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

И.М. БАРЫКИНА, Н.А. КУЗНЕЦОВ

УО «Гродненский государственный аграрный университет», г. Гродно, РБ

Поступила в редакцию 03.08.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Папилломатоз крупного рогатого скота – инфекционное заболевание, вызываемое вирусом семейства Папилломавиридэ (Papillomaviridae), характеризующееся образованием бородавок на коже и слизистой оболочке [1,2].

Папилломатоз крупного рогатого скота распространён повсеместно и может принимать форму эпизоотий. По частоте поражения животных заболеваниями опухолевой природы, занимает второе место (около 14 %), уступая лишь лейкозу (до 70 %) [3,4].

Клиническая картина весьма разнообразна. В подавляющем большинстве случаев папилломы локализуются на голове и шее, значительно реже на коже других частей тела (груди, холке, спине, вымени, половом члене). Встречаются данные о наличии папиллом в молочной цистерне вымени [2].

Цель исследования – на основании доступных источников литературы изучить микроскопическое проявление папилломатоза крупного рогатого скота.

Материал исследования: учебные пособия; публикации в научно-практических журналах, сборниках конференций; авторефераты, диссертации.

Методы исследования: составление библиографии, реферирование, конспектирование, цитирование, аннотирование; теоретический анализ; индуктивный и дедуктивный методы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В настоящее время выделено 13 типов вируса папилломатоза крупного рогатого скота (бычий вирус папилломатоза BPV), которые объединены в три рода [5,6]:

- ксипапиломавирусы: BPV-3, -4, -6, -9, -10, -11, -12;
- дельтапапиломавирусы: BPV-1, -2, -13;
- эпсилонпапиломавирусы: BVP-5, -7, -8.

По гистологическому действию папилломавирусы КРС подразделяются на две подгруппы:

- В А-подгруппу входят BVP 1, 2 и 5; вызывают фибропапилломы;
- В Б-подгруппу входят BVP 3, 4 и 6–10; вызывают папилломы.

К настоящему времени хорошо изучено 10 типов папилломавирусов крупного рогатого скота:

BVP 1 вызывает нитевидные, круглые бородавки серого цвета с грубой поверхностью от 0,5 до 30 см в диаметре. Чаще локализуются на сосках,

ноздрах и генитальном аппарате (пенисе, вульве и влагалище). Бородавки могут спонтанно исчезнуть через 1–12 месяцев. BVP 1 вызывает саркоидные поражения у лошадей;

BVP 2 вызывает развитие сидячих папиллом или на ножке серого цвета, шершавой поверхности, при длительном течении процесса, принимающие вид цветной капусты от 0,5–30 см в диаметре. Могут спонтанно исчезать через 1–12 мес. Чаще локализуются на голове, шее, груди, реже – на сосках;

BVP 2 способен вызывать неоплазмы в ЖКТ и мочевом пузыре, а также является причиной хронической энзоотической гематурией КРС. При постоянном воздействии иммунодепрессирующих веществ *BVP 2* способствует развитию злокачественных опухолей (карцином и сарком);

BVP 1 и 2 вызывают классический папилломатоз КРС;

BVP 3 вызывает атипичный папилломатоз КРС, характеризующийся образованием сидячих кожных папиллом, поражающих значительные участки кожных покровов, и не способных к спонтанному исчезновению;

BVP 4 индуцирует папилломы, локализующиеся на языке, слизистых оболочках нёба, глотки, пищевода, рубца, кишечника и мочевого пузыря. При постоянном воздействии иммунодепрессирующих веществ способствует развитию злокачественных опухолей;

BVP 5 вызывает развитие папиллом на сосках вымени беловатого цвета, напоминающих «семена риса». Спонтанно не исчезают;

BVP 6 индуцирует развитие непигментированных бородавок 1–2 см в диаметре, локализующихся на сосках вымени, способных к самопроизвольному исчезновению через год. Часто подвержены вторичному инфицированию;

BVP 7 вызывают поражения на коже и сосках;

BVP 8 – на коже и сосках;

BVP 9 – на сосках;

BVP 10 – на сосках.

Микроскопическое исследование папилломатоза крупного рогатого скота состоит из цитологического, гистологического и иммунофлуоресцентного анализа [2,7].

Цитологическое исследование мазков выявляет дискератоз, акантоз, паракератоз в сочетании с гиперплазией базального и парабазального слоев эпителия. Цитологическое исследование позволяет диагностировать только клиническую и субклиническую формы инфекции, давая в ряде случаев ложноотрицательный результат при плоскоклеточных интраэпителиальных поражениях высокой степени тяжести. Чувствительность метода составляет от 50 до 80%.

Гистологическое обследование выявляет резкое утолщение эпидермиса с нарушением его строения (рисунок 1 а, б). Эпидермальный пласт утолщался за счёт шиповатого, зернистого и рогового слоёв, вследствие гиперпродукции клеток и усиления их дифференцировки (рисунки 1, 2) [2].

Диагностически важным является обнаружение койлоцитов – больших эпителиальных клеток с гиперхромными ядрами и выраженной перинуклеарной вакуолизацией.

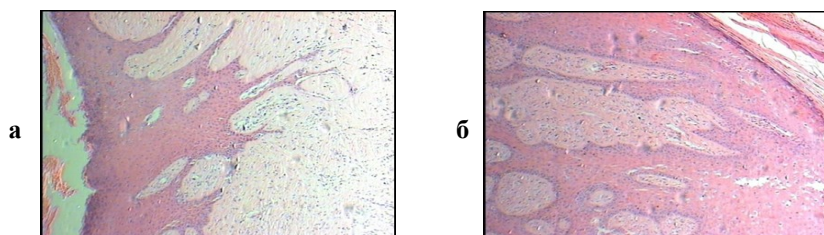


Рисунок 1 – Утолщение и разраст эпидермиса с формированием длинных выростов в дерму (акантотические тяжи). Окраска гематоксилин-эозин по Эрлиху. Микрофото. Ув.: а, б – 28. Биоскан

Отмечается акантолиз – как результат потери межклеточных десмосомальных связей между кератиноцитами с формированием различных по размеру интраэпидермальных пузырей, заполненных тканевой жидкостью или серозно-фибринозным экссудатом (рисунки 2 а, б).

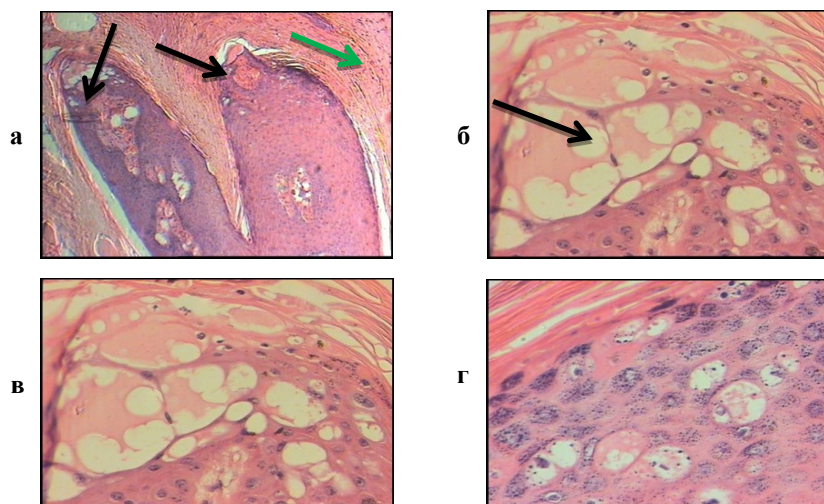


Рисунок 2 – Акантолиз. А – папилломатозные отростки, выступающие над поверхностью кожи, содержащие интраэпидермальные пузыри с жидкостью (надбазальный акантолиз) (чёрная стрелка). Отмечается гиперкератоз (зелёная стрелка). Б – внутриэпидермальные полости (стрелка). В, Г – вакуольная дистрофия кератиноцитов в шиповатом и зернистом слоях соответственно. Окраска гематоксилин-эозин по Эрлиху. Микрофото. Ув. а – 28; б, в, г – 140. Биоскан

Иммунофлуоресцентный анализ основан на выделении онкобелков Е6 и Е7. Метод позволяет дифференцировать носительство папилломовирусов и начинающиеся процессы опухолевой трансформации инфицированных клеток [7].

Выделение онкобелков Е6 и Е7 в материале указывает на:

- персистенцию папилломавируса;
- интегративную стадию инфекции;
- мутацию и повреждение клеточных белков;
- агрессивность начинающегося опухолевого процесса;
- неблагоприятный прогноз.

Неоспоримым достоинством определения Е7 является то, что в норме этот белок в тканях не синтезируется. Его происхождение полностью связано с жизненным циклом папилломавирусов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гистологическое и цитологическое исследования позволяют диагностировать только клиническую и субклиническую формы инфекции на основании обнаружения явления акантоза, паракератоза и койлоцитов.

Иммунофлуоресцентный анализ позволяет выявить вирусоносительство на основании выделения белков Е6 и Е7.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Кузнецов, Н. А. Фитотерапия – один из способов профилактики и лечения заболеваний животных / Н. А. Кузнецов, И.М. Барыкина // *Лекарственные растения: биоразнообразие, технологии, применение: сборник научных статей по материалам I Международной научно-практической конференции.* – Гродно: ГТАУ, 2014. – С.150–153
- 2 Барыкина, И.М. Папилломатоз крупного рогатого скота: распространение и морфологические изменения / И.М. Барыкина, А.В. Башура, Н.А. Кузнецов // *Наше сельское хозяйство: журнал настоящего хозяина.* – 2014. – № 14. – С.10–14.
- 3 Терехов, П.Ф. Ветеринарная клиническая онкология / П.Ф. Терехов. – Москва: Колос, 1983. – 208 с.
- 4 Целищев, Л.И. Болезни вымени коров / Л.И. Целищев // *Ставрополь: Кн. изд-во*, 1981. – 104 с.
- 5 Co-infection of bovine papillomavirus type-1 and -10 in teat warts of dairy cattle / P. Kumar etc. // *Veterinari Medicina* – 2013. – №58 (12). – P.605–608.
- 6 Salib, F.A. Clinical, epidemiological and therapeutic studies on Bovine Papillomatosis in Northern Oases, Egypt in 2008 / F.A. Salib, S.A. Farghali // *Veterinary World.* – 2011. – Vol.4(2). – P.53–59
- 7 Долгополова, И.А. Папилломавирусная инфекция – клиника, диагностика, лечение / И.А. Долгополова // *Педиатрическая фармакология.* – 2007. – Т.4. – №1 – С. 56–60.

УДК 619:615.371:616.98:578.825.15:636.2

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ИММУНОГЕННОСТЬ ВАКЦИН ПРОТИВ
ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КРУПНОГО РОГАТОГО
СКОТА В УСЛОВИЯХ ХОЗЯЙСТВА, НЕ ПРОВОДЯЩЕГО
СПЕЦИФИЧЕСКУЮ ПРОФИЛАКТИКУ**

П.П. КРАСОЧКО¹, Я.П. ЯРОМЧИК¹, Л.С. КАШКО²

¹УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия
ветеринарной медицины», г. Витебск, РБ

²ФГБОУ ВО «Смоленская государственная сельскохозяйственная
академия», г. Смоленск, РФ

Поступила в редакцию 04.08.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусные инфекции у молодняка крупного рогатого скота широко распространены и наносят существенный экономический ущерб животноводству. При этом заболеваемость животных достигает 75–90%, а гибель – до 30%. Из спектра возбудителей крупного рогатого скота особое место принадлежит вирусу инфекционного ринотрахеита (ИРТ). Для успешной борьбы с данной инфекцией необходимы своевременная диагностика заболевания, а также средства специфической профилактики и терапии.

Однако при проведении диагностических исследований среди крупного рогатого скота практически не выявляются серонегативные животные, т.е. все животные или переболели ИРТ, или были ранее вакцинированы. В этой связи на многих фермах или комплексах у животных уровень антител бывает очень высокий (свыше 1:128–1:256) или более низкий (1:16–1:32) поэтому использование вакцин, имеющихся на рынке Республики Беларусь, не всегда дает желаемый эффект. Учитывая вышесказанное, нами проведено сравнительное изучение иммунного ответа у животных на введение различных вакцин в хозяйстве, не проводящем специфическую профилактику инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнялись в условиях НИИ прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» и хозяйстве, которое не проводит специфическую профилактику ИРТ КРС.

Для изучения гуморального иммунного ответа крупного рогатого скота на введение структурных рекомбинантных белков и антигенов вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота проводили вакцинацию животных согласно таблице 1.

При постановке опыта были сформированы 8 групп по 5–10 голов из клинически здоровых коров. Критерием отбора животных служил обязательный низкий фоновый уровень специфических антител (отрицательный в ИФА – коэффициент блокировки на уровне сомнительного результата), а

также, как минимум, вторая лактация у коров. Все группы, за исключением контрольной, подвергались двукратной вакцинации отдельными вакцинами с интервалом 21 день, при этом стельные животные не обрабатывались живыми вакцинами во избежание возможных аборт. Отбор крови проводили в первый день опыта, на 10, 21 (день ревакцинации), 35 и 60 день. Полученную кровь оставляли в теплом месте (при возможности помещали в термостат при температуре 37°C) на 2 часа, после чего обводили сгусток металлической спицей или длинной иглой, ставили в холодильник при температуре +2+4°C на 12–18 часов. После этого сыворотку отбирали дозаторами в чистые пробирки. Если в пробирку попадала взвесь эритроцитов, то дополнительно центрифугировали 10 мин при 3000 об./мин.

Таблица 1– Схема опыта

Группа животных	Наименование вакцины	Доза, см ³	Интервал введения, способ введения
группа №1	вакцина рекомбинантная инактивированная против ИРТ КРС	2	двукратно с интервалом 21 день
группа №2	вакцина рекомбинантная инактивированная эмульгированная против ИРТ КРС	2	двукратно с интервалом 21 день
группа №3	вирус-вакцина живая культуральная против ИРТ КРС	2	двукратно с интервалом 21 день
группа №4	вирус-вакцина трехвалентная живая культуральная против ИРТ КРС, ВД и ПГЗ – «Тривак»	3	двукратно с интервалом 21 день
группа №5	вирус-вакцина поливалентная инактивированная культуральная против ИРТ КРС, ВД, рота- и коронавирусной инфекции – «Тетравак»	5	двукратно с интервалом 21 день
группа №6	вакцина живая BovishieldGold	2	двукратно с интервалом 21 день
группа №7	вакцина инактивированная «Комбовак»	3	двукратно с интервалом 21 день
контрольная группа	физиологический раствор	3	двукратно с интервалом 21 день

Для определения уровня специфических антител использовали диагностический ИФА набор IDEXX IBRX3. Постановку реакции проводили в соответствии с инструкцией по применению. Сыворотки разводили 1:500 и использовали в реакции. Время первичной инкубации составляло 2 часа. Учет результатов проводили на длине волны 450 нм.

При обработке результатов использовали формулу расчета коэффициента блокирования антител, выраженную в процентах. Чем выше коэффициент блокировки, тем выше содержание антител.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При проведении опыта не отмечались какие-либо отклонения в состоянии животных по отношению к физиологической норме. В местах введения биопрепаратов образования абсцессов не выявлено.

При постановке ИФА были получены первичные данные, которые при статистической обработке и приведении к средним значениям в группе отражены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты серологического исследования при изучении особенностей гуморального иммунного ответа на различные типы вакцин (% блокировки антител)

№ группы	Наименование вакцины	День отбора крови				
		1	10	21	35	60
1	вакцина рекомбинантная инактивированная против ИРТ КРС	10,48± 3,10	14,24± 5,99	10,12± 4,96	21,02± 8,50	41,72± 11,94
2	вакцина рекомбинантная инактивированная эмульгированная против ИРТ КРС	14,21± 3,39	13,19± 2,24	16,43± 8,62	23,82± 9,45	45,37± 10,76
3	вирус-вакцина живая культуральная против ИРТ КРС	8,79± 2,75	88,04± 2,44	13,75± 3,97	81,34± 3,04	82,15± 1,84
4	«Тривак»	9,33± 2,78	84,60± 1,65	82,67± 2,08	90,88± 1,01	90,85± 1,10
5	«Тетравак»	10,14± 4,65	86,73± 2,30	89,33± 2,27	95,90± 0,30	96,09± 0,20
6	«Bovishield Gold»	8,34± 1,24	79,34± 1,78	90,92± 1,17	95,43± 0,41	96,44± 0,20
7	«Комбовак»	17,35± 8,07	66,18± 8,23	88,73± 2,84	94,05± 0,89	92,80± 1,26
контроль	—	10,21± 1,81	19,07± 5,31	33,00± 8,59	28,15± 8,00	31,85± 9,14

Примечание – коэффициент достоверности $P < 0,01$

Как видно из таблицы, все коммерческие вакцины обладают должной иммуногенностью и увеличивают титр антител до практически максимального уровня. При этом наилучшей эффективностью обладают вакцины «Bovishield Gold» и «Тетравак».

При сравнении иммуногенности живых и инактивированных вакцин наилучшие результаты в данном типе хозяйств показывают инактивирован-

ные вакцины, за исключением вакцины «Bovishield Gold», которая показывает такие же хорошие результаты, как и инактивированные.

Экспериментальные вакцины на основе рекомбинантного штамма, спонтанно персистирующего геномом вируса ИРТ КРС, обладают иммуногенностью, но при этом достигают только минимального значения защитного титра антител. Однако следует учитывать, что при подготовке данных опытных образцов вакцин не проводилась работа по оптимизации препарата (способ обработки бактерий, дозировка антигена, кратность введения).

В ходе опыта была сформирована дополнительная группа животных, имеющих высокий титр специфических антител против ИРТ КРС. Данной группе вводили вакцину инактивированную культуральную против ИРТ КРС, отбор проб проводили аналогично вышеописанным группам.

В результате установлено, что введение вакцины не отражается на титре антител. В ходе опыта титры антител имели несущественные колебания, и при сравнении начального и конечного результата он оставался одинаковым на уровне статистической погрешности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что как живые так и инактивированные вакцины обладают высокой иммуногенностью, но при этом инактивированные позволяют получить более высокие титры антител.

Испытанные рекомбинантные образцы вакцин имеют потенциал для использования в качестве специфического биопрепарата при должном подходе и дополнительных исследованиях по оптимизации иммунного ответа.

Использование вакцины на фоне высокого уровня антител не дает должного иммунного ответа, и титр антител остается на прежнем уровне. В связи с этим, перед вакцинацией животных с неизвестным серостатусом необходимо проводить лабораторные серологические исследования.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Зелютков, Ю.Г. *Инфекционные энтериты новорожденных телят: монография*. Витебск: УО ВГАВМ, 2006. – 188 с.
- 2 Кашко, Л.С. Серологический мониторинг крупного рогатого скота в отношении вирус-возбудителей пневмоэнтеритов телят / Л.С. Кашко, П.П. Красочко // М: Достижения науки и техники в АПК. – 2014. – №11. – Т.28. – С.66–68.
- 3 Красочко, П.А. *Болезни сельскохозяйственных животных* / П.А. Красочко, М.В. Якубовский, А.И. Ятусевич [и др.] // науч. ред. Красочко П.А. Минск: Бизнес-офсет, 2005. – 800 с.
- 4 Современная диагностика инфекционных заболеваний крупного рогатого скота: учебно-методическое пособие / А.Р. Камошенков, П.А. Красочко, Л.С. Кашко, С.М. Грибко, П.П. Красочко // Под общей редакцией П.А. Красочко. Смоленск: Изд-во ФГБОУ ВПО «Смоленская ГСХА», 2013. – 84 с.
- 5 Kollanur, J.D., Radhika, Syam. Chauhan, R.S. Epidemiological studies on infectious bovine rhinotracheitis (IBR) in different parts of India // International Journal of Livestock. – 2014. – 4(5). – P.21–27.

УДК:615.371

**СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ПАРЭНТЕРАЛЬНЫЕ СПОСОБЫ ВВЕДЕНИЯ
ВАКЦИН ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ
ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖИВОТНЫХ**

В.П. КРАСОЧКО

*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная
академия ветеринарной медицины», г. Витебск, РБ*

Поступила в редакцию 04.08.2015 г.

Специфическая иммунопрофилактика (предохранительная вакцинация) – проведение прививок в благополучном хозяйстве с целью создания у животных иммунитета на случай их возможного заражения впоследствии.

Основными воротами инфицирования и естественной иммунизации организма являются кожа, слизистая дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта. Иммунитет к любому возбудителю инфекционных заболеваний можно получить практически при любом способе вакцинации. При выборе метода введения вакцины учитываются такие факторы как ее безопасность, эффективность, экономичность, производительность, простота применения вакцины.

Парентеральные методы вакцинации включают все способы введения антигена, минуя желудочно-кишечный тракт (внутримышечный, внутрикожный, подкожный, интраназальный или аэрозольный).

Внутримышечный способ введения является одним из первых наиболее распространенным способом введения вакцин. Несмотря на высокую эффективность он обладает рядом недостатков, которые способствуют апробации иных способов введения. Во первых, это стрессирование, которая доставляет болевые ощущения животному. Во вторых, это строгое соблюдение правил асептики при иммунизации животных, т.к. нередки случаи перезаражения животных при повторном использовании игл и шприцов или образования абсцессов на месте введения. Также следует учитывать индивидуальную реактивность организма, когда возможны анафилактические реакции, и низкую технологичность при вакцинации большого поголовья. В связи с этим набирают популярность другие парентеральные способы введения вакцин.

Интраназальная или ее разновидность – аэрозольная вакцинация приобрела широкую популярность в птицеводстве благодаря ее высокой производительности и эффективности. Кроме того, широко используется при иммунизации крупного рогатого скота. Как правило, для интраназальной вакцинации используют аттенуированные живые вакцины. Инактивированные вакцины не показывают высокой эффективности, так как защитные механизмы слизистой оболочки не дают антигенам проникнуть внутрь и тем самым стимулировать иммунную систему.

Механизм действия интраназальных вакцин заключается в размноже-

нии патогена в слизистой оболочке и активной стимуляции клеток иммунной системы. Слизистая оболочка является первым барьером перед возбудителями инфекционных болезней, поэтому в ее структуре имеется большое количество клеток иммунной системы (В-лимфоциты, дендритные клетки, макрофаги, тучные клетки и др.). При размножении вирусов или бактерий в слизистой оболочке их антигены захватываются дендритными клетками или макрофагами и транспортируются в регионарные лимфоузлы, где происходит процесс антиген-презентации и активация Т- и В-лимфоцитов. После этого лимфоциты мигрируют назад в слизистую оболочку. При этом В-лимфоциты выделяют секреторные иммуноглобулины А и G, которые в последующем защищают организм от повторного инфицирования.

При использовании интраназальных вакцин главным образом задействуется местный мукозальный иммунитет и в меньшей степени системный. Это связано с путем миграции дендритных клеток от слизистой к регионарным лимфоидным образованиям, а активированных лимфоцитов обратно в слизистую оболочку. Поэтому такой тип вакцинации наиболее эффективен при респираторных инфекциях, где местом репликации вирусов или бактерий является слизистая респираторного тракта.[7]. Однако, недавние исследования Yeet al. на мышах показали возможность преодоления местных мукозальных механизмов и активации общей иммунной системы. [6] В этом эксперименте действовал механизм переноса антител с помощью неонатального Fcрецептора (FcRn). Он используется у новорожденных для переноса антител класса Gc поверхности слизистой, через нее во внутриклеточное пространство. Сформировав конструкцию из FcRn и гликопротеина Герпесвируса (HSV-2), вводили ее мышам совместно с олигонуклеотидным адъювантом CpG. При этом у мышей дикого типа (имеющих рецепторы FcRn) наблюдалось образование gD-нейтрализующих антител класса G и gD-специфичных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в селезенке. У линии мышей без данного рецептора различные комбинации иммунизации (рекомбинантная конструкция, рекомбинантная конструкция и адъювант, гликопротеин D) не дали какого либо существенного иммунного ответа. Таким образом, эти исследования показывают перспективу использования интраназальной иммунизации не только для профилактики респираторных инфекционных болезней.

Методы с нарушением целостности кожи получили название деструктивных или чрезкожных методов. Процесс иммунизации начинается в местах инъекции антигена, который фагоцитируется и перерабатывается вспомогательными клетками (макрофагами, дендритными клетками и пр.), а затем представляется лимфоцитами. Антиген и клетки, премированные антигеном, могут проникать через лимфатические сосуды в грудной проток, а оттуда – в кровь. Они могут оседать в других лимфоидных и нелимфоидных органах, обеспечивая развитие общего иммунитета.

Большинство вакцин вводится подкожно – обычно используется для несорбированных вакцин. Растворимые вакцины сохраняются в подкожной клетчатке до 5 дней, а сорбированные препараты – до 1 мес и более, а сорбированные препараты – внутримышечно. При этих способах вакцинации создаются благоприятные условия для создания депо и проникновения ан-

тигена в регионарные и отдаленные лимфатические узлы. Объем вакцины при внутримышечном введении может превышать в 2–3 раза количество вакцины, вводимой подкожно. Но при использовании такого способа введения не учитывается тот факт, что в самой коже находится намного больше иммунокомпетентных и презентующих клеток, способных запускать иммуногенез, чем в подкожном пространстве.

В настоящее время особое внимание уделяется внутрикожному способу вакцинации. Это связано с морфологическими особенностями строения кожи, которая представляет собой высокоорганизованный орган иммунной системы, который имеет необходимый состав иммунокомпетентных клеток, кооперируются между собой как с помощью комплементарных структур на их поверхности, так и при участии иммунорегуляторных цитокинов. Подобная организация способствует участию кожи как в иммунных реакциях всего организма, так и осуществлять некоторые иммунологические процессы самостоятельно, выполняя одновременно роль центрального и периферийного органа иммуногенеза.

В строении кожи выделяют 3 основных слоя: роговой, который представлен омертвевшими клетками эпидермиса и выполняет роль механического барьера; эпидермис – динамическая область, в которой постоянно делятся его клетки и перемещаются клетки иммунной системы; дерма соединяет эпидермис с соединительной тканью, кровеносными и лимфатическими сосудами. В эпидермисе наибольшее количество антиген-презентирующих клеток: клетки Лангерганса занимают до 25% общей площади кожи при количестве 3% от числа клеток эпидермиса, также значительное количество дендритных клеток, выполняющих функцию иммунного контроля и антиген-презентации. Дерма содержит транзитные дендритные клетки и клетки Лангерганса, а также Т-лимфоциты, 95% которых являются Т-клетками памяти. В связи с этим эпидермис является наилучшим местом для введения биопрепаратов.

Внутрикожная иммунизация по своему механизму развития иммунного схожа с внутримышечным введением и использование адъювантов позволяет получать более высокие результаты стимуляции иммунной системы. Так в клинических экспериментах на лабораторных животных было показано полная их защита от ботулинистического токсина при предварительной внутрикожной иммунизации с использованием LT-токсина в качестве адъюванта.[8] Помимо стимуляции общей иммунной системы и образования высоких титров IgG, внутрикожная иммунизация стимулирует иммунитет слизистой оболочки ввиду общности рецепторов лимфоцитов. Поэтому при внутрикожной иммунизации отмечается миграция В-лимфоцитов в слизистую и выявление секреторных IgA и IgG на поверхности слизистой.

Ввиду высокой концентрации антиген-презентирующих клеток значительно снижается иммунизирующая доза. Проведенные исследования показали, что возможно снижение количества вводимого антигена в 5–10 раз по сравнению с внутримышечным введением и получение одинакового иммунного ответа.

Таким образом, в настоящее время одним из перспективных спосо-

бов введения вакцин является внутрикожный. Литературные данные показывают, что данный способ введения по силе стимуляции иммунной системы не уступает внутримышечному, но при этом обладает существенными преимуществами, которые позволят не только снизить стоимость дозы вакцины, но и улучшить технологичность вакцинации.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 <http://www.eurolab.ua/immunizations/2414/3873/35221/>
- 2 Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота [Текст]/ А.Г. Гловтов [и др.]. – Новосибирск, 2006. – 193 с.
- 3 Тузова-Юсковец, Р.В. Классическая и современная иммунология/ Р.В. Тузова-Юсковец, Н.А. Ковалев.–Минск:Белорус.наука,2006.–691с.
- 4 Карпуть И.М. Иммунология и иммунопатология болезней молодняка.–Мн.: Ураджай, 1993.– 288 с.
- 5 Abbas, Abul K. Cellular and molecular immunology/ Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. – Philadelphia: Elsevier, 2012. — 7th ed.– 554 p.
- 6 Efficient mucosal vaccination mediated by the neonatal Fc receptor Lilin Ye, Rongyu Zeng, Yu Bai. et al. Nat. Biotechnol. 29.–P.158–163 (2011).
- 7 J.R. McGhee The use of a natural IgG transport system to deliver a mucosal vaccine is a step toward needle-free immunization. Nature Biotechnology 29. –2011, 136–138.
- 8 Sharton-Kersten, T., Yu, J., Vassel, R. Transcutaneous immunization with bacterial ADP-ribosylating exotoxins, subunit and unrelated adjuvants. Infect. Immun. 68(9), – 2000. – P.5306–5313.

УДК 619:616.988:636.22

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ ДНК-АПТАМЕРОВ
С ПРИОНОМ ГУБКООБРАЗНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ КОРОВ
ИЗ ТКАНЕЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ**

А.А. АНТИПИН, Г.А. НАДТОЧЕЙ

*ФГБНУ «Всероссийский институт экспериментальной ветеринарии
им. Я.П. Коваленко», Москва, РФ*

Поступила в редакцию 02.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Прионы – особый класс инфекционных агентов, вызывающих неизлечимые заболевания центральной нервной системы человека и животных. Они отличаются от других патогенов (вирусов, бактерий и др.) тем, что у них отсутствует какой-либо геном, состоящий из ДНК или РНК, а их инфекционные свойства связаны с белком. Уникальная особенность прионных заболеваний заключается в том, что они могут возникать не только в результате заражения. Известны их спорадические и наследственные формы, причем вне зависимости от происхождения заболевания оно может быть передано далее инфекционным путем. В последние годы интерес к прионным болезням возрос в связи с эпидемией губкообразной энцефалопатии коров (так называемое "бешенство коров") в Англии, возбудителем которой является прион, и с возможностью передачи этого заболевания людьми – ее эпидемической опасностью [1]. Патогенные прионы отличаются высокой устойчивостью к обычным методам обеззараживания [2]. Инфекционный прионный белок животных, названный PrP^{Sc}, представляет собой особую изоформу клеточного белка PrP^C, отличающуюся от него по своей пространственной структуре (конформации). Инфекционная форма белка PrP, попадая в организм извне или спонтанно в нем возникая, способствует превращению обычного PrP^C в патогенный PrP^{Sc} посредством белок-белковых взаимодействий.

Многообещающей альтернативой существующим подходам для диагностики прионных заболеваний является использование специфических ДНК- и РНК-аптамеров, коротких олигонуклеотидов, полученных методом Evolution of Ligands by Exponential enrichment (SELEX). Использование аптамеров для детекции прионов позволяет использовать процедуру цепной полимеразной реакции, упрощая и многократно увеличивая чувствительность метода. Имеются сообщения исследователей о получении и специфическом взаимодействии РНК- и ДНК-аптамеров с прионным белком, аналогичном взаимодействию этого белка со специфическими антителами (3–12). В работе российских авторов получены ДНК-аптамеры, детектирующие амилоидные эпитопы (13). Цель нашей работы – изучить эффективность их связывания с прионом губкообразной энцефалопатии коров из тканей центральной нервной системы (ЦНС).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследования были пробы тканей ЦНС коров, экспериментально зараженных губкообразной энцефалопатией. Контроль наличия в патологическом материале прионов возбудителей губкообразной энцефалопа-

тии проводили методами ИФА (Kit for Detection TESEE, BioRad) и иммуноблоттинга. Наличие специфических патологических изменений в тканях ЦНС определяли гистологическим методом с окрашиванием срезов гематоксилином и эозином. Прионный белок выделялся по методу Prusiner S.B. et al. [14]. Морфологические структуры, образуемые им, изучали электронной микроскопией методом негативного контрастирования на электронном микроскопе JEOL-100CX.

Были приготовлены гомогенаты ткани ЦНС, содержащие прионный белок губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота (BoPrP) в достаточно высокой концентрации, чтобы его можно было надежно выявить методом ИФА и обеспечить аналогичные условия проведения опытов по проверке активности связывания с белком PrP^{sc} значительного числа аптамеров. Отбор положительного материала для изготовления гомогената провели с использованием диагностического набора фирмы BioRad по протоколу фирмы. Исследовали ткани двух больных губкообразной энцефалопатией животных: мозжечок, поясничный отдел спинного мозга и кору головного мозга. Учитывая количество имеющегося в наличии патматериала, гомогенат для дальнейших опытов готовили из ткани коры головного мозга животного №8618.

Для изготовления гомогената использовали гомогенизатор фирмы Heidolph, диспергирующую насадку 7F/S. Готовили 10% суспензию в холодном забуференном физрастворе, pH 7,5, содержащем 0,5% NP-40 и 0,5% дез-оксихолата натрия. Полученный гомогенат разводили равным объемом 4% N-саркозината натрия в забуференном физрастворе, pH 7,5, инкубировали при температуре 37⁰C в течение 15 минут при постоянном перемешивании. Затем материал осветляли центрифугированием при 4000 об/мин в течение 5 минут. В надосадок вносили протеиназу К 50 мкг/мл и смесь инкубировали в течение часа при температуре 37⁰C. Реакцию останавливали добавлением в смесь до 5 mM PVSF. Белок BoPrP преципитировали добавлением в смесь 4% раствора фосфорновольфрамовокислого натрия в 0,17 M растворе MgCl₂, pH 7,4, до конечной концентрации фосфорновольфрамовокислого натрия 0,3%. Материал инкубировали 1 час при температуре 37⁰C после чего преципитат осаждали центрифугированием при 15000 g в течение 30 минут. Осадок ресуспендировали в 0,05M Трис-буфере, pH 7,5, содержащем 2% N-саркозината натрия, делили на аликвоты 800 мкл и хранили при температуре -84⁰C до использования.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эффективность связывания аптамеров с прионом губкообразной энцефалопатии коров изучали методом иммуноферментного анализа в сэндвич

варианте, заменяя вторичные антитела аптамерами, связанными с конъюгатом стрептавидин – пероксидаза. В качестве твёрдой фазы – полистироловые стрипы диагностического набора фирмы «BioRad», лунки которых покрыты первичными моноклональными антителами к синтетическому полипептиду прионного белка. Такой подход к решению проблемы позволяет свести до минимума влияние на результаты анализа примесей, загрязняющих препарат используемого в опытах прионного белка, а также оценить результаты опыта экспериментально. В качестве отрицательного контроля на аптамер использовали биотинилированный олигонуклеотид S70г вырожденной структуры. Результаты взаимодействия ДНК-аптамеров с прионом губкообразной энцефалопатии коров (BoPrP)* приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты ИФА связывания ДНК-аптамеров с прионом губкообразной энцефалопатии коров (BoPrP)*

Аптамер Материал	S8	S10	S12	S13	S15	S16	S17	S18	S39	S41	S70
BoPrP гомогенат мозга боль- ной коровы	0.924	0.106	0.672	1,341	1,010	0,365	0,006	0,268	1,121	0,891	0.612
Гомогенат мозга здоровой коровы	0.427	0.077	0.044	1,154	1,029	0,581	0,042	0,182	0,505	0,308	0.775
Отношение (BSE/N)**	2.160	1.380	15.27 0	1,160	0,980	0,620	–	1,470	2,22	2,890	0.790

Примечание – *показатель поглощения при 450 нм за минусом фона буфера для разбавления; ** соотношение показателя поглощения положительной на BSE пробы мозга и показателя поглощения пробы мозга здоровой коровы

Анализ результатов, представленных в таблице 1, показывает, что из 10 проверенных аптамеров перспективными можно считать четыре: S8, S12, S39 и S41. Они дали более высокие показатели связывания с материалом, содержащим патогенный прион, т.е. проявили специфическое связывание. Оптическая плотность, показанная этими аптамерами с патогенным прионом, превышает плотность аптамеров с пробами от здорового животного в 2,160; 15,270; 2,220 и 2,890 раз соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из 10 исследованных аптамеров 4 показали высокую эффективность связывания с прионом губкообразной энцефалопатии коров. Наиболее перспективным следует считать аптамер S12. Дальнейшие работы с использованием ДНК-аптамеров могут привести к созданию новых высокоэффективных способов диагностики губкообразной энцефалопатии коров.

ЛИТЕРАТУРА

1 Надточей, Г.А. (2012). Прионные инфекции: степень риска для животного-

водства и населения России/ Г.А. Надточей, М.И. Гулюкин // Жизнь без опасностей №2. – С.40–45.

2 Lasmezas, C.I., Fournier, J.G., Nuvel, V., Boe, H., Marce, D., Laumory, F., Kopp N., Hauw, J.J., Ironside, J., Bruce, M., Dormont, D., Deslys, J.P. (2001). Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeld-Jakob disease: implications for human health. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98, 4142–4147.

3 Weiss, S., Proske, D., Neumann, M., Groschup, M. H., Kretzschmar, H.A., Famulok, M., Winnacker E. L. (1997). RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP. *J.Virol. Nov*;71(11), 8790–8797.

4 Proske, D., Gilch, S., Wopfner, F., Schätzl, H.M., Winnacker, E.L., Famulok, M. (2002). Prion-protein-specific aptamer reduces PrP^{Sc} formation. *Chembiochem.* Aug 2; 3(8):717–25.

5 Rhie, A., Kirby, L., Sayer, N., Wellesley, R., Disterer, P., Sylvester, I., Gill, A., Hope, J., James, W., Tahiri-Alaoui A. (2003). Characterization of 2'-fluoro-RNA aptamer that bind preferentially to disease-associated conformations of prion protein and inhibit conversion. (2003). *J. Biol. Chem.* Oct10; 278(41):39697–705.

6 Takemura, K., Wang, P., Vorberg, I., Surewicz, W., Priola, S.A., Kanthasamy, A., Pottathil, R., Chen, S.G., Sreevatsan, S. (2006). DNA aptamers that bind to PrP(C) and not PrP(Sc) show sequence and structure specificity. *Exp.Biol.Med (Maywood).* Feb; 231(2):204–14.

7 Ogasawara, D., Hasegawa, H., Kaneko, K., Sode, K., Ikebukuro K. (2007). Screening of DNA aptamer against mouse prion protein by competitive selection. *Prion.* Oct-Dec;1(4):248–54.

8 Bibby, D.F, Gill, A.C, Kirby, L, Farquhar, C.F., Bruce, M.E., Garson, J.A. (2008). Application of a novel in vitro selection technique to isolate and characterise high affinity DNA aptamers binding mammalian prion proteins. *J. Virol. Methods.* Jul;151(1):107–15.

9 Kazuyoshi Murakami, Fumiko Nishikawa, Ken Noda, Takashi Yokoyama, Satoshi Nishikawa (2008). Anti-bovine prion protein RNA aptamer containing tandem GGA repeat interacts both with recombinant bovine prion protein and its β isoform with high affinity. *Prion.* Apr-Jun; 2(2): 73–80.

10 Tsukasa Mashima, Akimasa Matsugami, Fumiko Nishikawa, Satoshi Nishikawa, Masato Katahira (2009). Unique quadruplex structure and interaction of an RNA aptamer against bovine prion protein. *Nucleic Acids Res.* Oct; 37(18): 6249–6258.

11 Wang, P., Hatcher, K.L., Bartz, J.C., Chen, S.G., Skinner, P., Richt, J., Liu, H., Sreevatsan, S. (2011). Selection and characterization of DNA aptamers against PrP (Sc). *Exp Biol Med (Maywood).* Apr 1; 236(4):466–76.

12 Tsukasa Mashima, Fumiko Nishikawa, Yuji O. Kamatari, Hiromichi Fujiwara, Masayuki Saimura, Takashi Nagata, Tsutomu Kodaki, Satoshi Nishikawa, Kazuo Kuwata, and Masato Katahira (2013). Anti-prion activity of an RNA aptamer and its structural basis. *Nucleic Acids Res.* Jan; 41(2): 1355–1362.

13 Olga V. Mitkevich, Natalia V. Kochneva-Pervukhova, Elizaveta R. Surina, Sergei V. Benevolensky, Vitaly V. Kushnirov, Michael D. Ter-Avanesyan (2012). DNA aptamers detecting generic amyloid epitopes. *Prion.* September 1; 6(4): 400–406.

14 Prusiner S.B. et al. (1993). Immunologic and molecular biologic studies prion proteins in bovine spongiform encephalopathy. *J.infect. Dis.* 167, 602–613.

УДК 619:616.98:578.842.1:577.2

**ИСПЫТАНИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ
ДИАГНОСТИКИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ
МЕТОДОМ ИММУНОБЛОТТИНГА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА Р30**

О.А. ДУБРОВСКАЯ¹, А.С. КАЗАКОВА¹, И.Р. ИМАТДИНОВ¹,
А.П. ВАСИЛЬЕВ¹, А.Д. СЕРЕДА¹, П.А. КРАСОЧКО², Д.В. КОЛБАСОВ¹

¹ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной
вирусологии и микробиологии РАСХН», пос. Вольгинский, РФ

²РУП «Институт экспериментальной ветеринарии
им. С.Н. Вышеслесского», г. Минск, РБ

Поступила в редакцию 14.09.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Африканская чума свиней (АЧС) – контагиозная, септическая болезнь свиней, характеризующаяся лихорадкой, признаками токсикоза, геморрагическим диатезом и высокой летальностью. К АЧС восприимчивы домашние свиньи и дикие кабаны независимо от породы и возраста, у которых болезнь может протекать сверхостро, остро, подостро, хронически и бессимптомно. Поскольку вакцины против АЧС не разработаны, то для ликвидации и предупреждения распространения болезни применяются тотальный убой свиней в первой угрожаемой зоне, а также жесткие карантинные мероприятия во второй угрожаемой зоне. С учетом этого лабораторная диагностика имеет огромное значение для принятия решений о ликвидации вспышек и контроля за распространением болезни.

Есть все основания опасаться, что в результате многократного пассивирования вируса АЧС в популяциях диких кабанов европейских стран могут появиться изоляты, вызывающие не острую, как в настоящее время, форму течения болезни, а хроническую или бессимптомную.

Современные методы лабораторной диагностики АЧС, основанные на определении вирусных антигенов или ДНК, не всегда обеспечивают выявление животных, инфицированных ослабленными по вирулентности изолятами. В этих случаях наиболее информативными являются серологические методы, основанные на определении антител к вирусным белкам в пробах сывороток крови или органов иммунной системы свиней.

Согласно рекомендациям Международного эпизоотического бюро (МЭБ) для подтверждения сомнительных результатов лабораторной серодиагностики АЧС непрямым твердофазным иммуноферментным анализом (ТФ ИФА) или непрямой реакцией иммунофлуоресценции (РНИФ) следует использовать метод иммуноблоттинга. В рекомендованных МЭБ тест-системах для выявления антител к вирусу АЧС методом иммуноблоттинга вирусные антигены происходят из живого вируса, что предполагает манипуляции с инфекционным агентом при их изготовлении. Применение вместо живого вируса бактериальных продуцентов рекомбинантных белков гарантирует биологическую безопасность производства и высокую специфичность диа-

гностических тест-систем [1, 2]. Установлено, что в ранние сроки после заражения низко-, умеренно- и высоковирулентными штаммами вируса АЧС в сыворотках крови свиней преимущественно выявляются антитела к структурному вирусному белку р30 [3]. Было показано, что чувствительность и специфичность непрямого ТФ ИФА при использовании рекомбинантного белка р30 для обнаружения антител к вирусу АЧС в сыворотках экспериментально инфицированных свиней и в полевых сыворотках от серопозитивных животных с бессимптомным течением болезни составляют 96 % и 99 % соответственно [4].

Ранее нами были изготовлены нитроцеллюлозные иммунострипы с иммобилизованным на них полипептидом рекомбинантного белка р30 вируса АЧС и продемонстрирована их пригодность для выявления серопозитивных свиней при острой и хронической формах АЧС методом иммуноблоттинга [5].

Данная работа выполнена с целью испытать разработанную тест-систему для серодиагностики АЧС методом иммуноблоттинга, в том числе, с задачей выявления серопозитивных животных с хронической или бессимптомной формами АЧС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При проведении исследований были использованы домашние свиньи породы крупная белая и дикий кабан массой до 50 кг. Штаммы вируса АЧС – из «Музея штаммов» ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии. Для постановки РНИФ и непрямого варианта ТФ ИФА применяли диагностические наборы производства ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии. РНИФ, не прямой ТФ ИФА и метод иммуноблоттинга выполняли по рекомендациям МЭБ [2]. Пробы сывороток крови, органов свиней и кабана получали после воспроизведения на них в лабораторных условиях хронической и бессимптомной форм инфекции.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Разработанная «Тест-система для серологической диагностики африканской чумы свиней методом иммуноблоттинга» (далее тест-система) сформирована из двух комплектов, которые хранятся при различных температурных режимах.

- Комплект №1 с температурой хранения от 2°C до 6°C включает:
- иммунострипы (50 шт.) – нитроцеллюлозные тест-полоски 3,0 см×0,3 см с полипептидом очищенного рекомбинантного белка р30;
 - 10×ФБР (5 флаконов по 4,0 см³) – 10×фосфатный буферный раствор;
 - 10×ФБР-т (5 флаконов по 40,0 см³) – 10×ФБР с 1 % твина-20;
 - H₂O₂ 33 % (5 пробирок по 0,2 см³) – раствор перекиси водорода.
- Комплект № 2 с температурой хранения от -18°C до -20°C включает:
- K⁺ (5 пробирок по 0,025 см³) – положительная инактивированная контрольная сыворотка;
 - K⁻ (5 пробирок по 0,025 см³) – отрицательная контрольная сыворотка;
 - 2000 × конъюгат (5 пробирок по 0,01 см³) протеина А с пероксидазой хрена;
 - ДАБ (5 пробирок по 0,02 г) – 3,3' диаминобензидин тетрагидрохлорид.

Хроническую и бессимптомную формы АЧС воспроизводили благодаря использованию аттенуированных штаммов вируса. В лабораторных условиях в различные сроки после внутримышечной инокуляции вируса АЧС были получены 54 пробы сывороток крови свиней и дикого кабана на каждый из ниже перечисленных:

- негемадсорбирующий аттенуированный штамм PSA-1-NH (I сероиммунотип);
- гемадсорбирующий аттенуированный штамм КК-262/с (II сероиммунотип);
- гемадсорбирующий аттенуированный штамм МК-200 (III сероиммунотип);
- гемадсорбирующий аттенуированный штамм ФК-135 (IV сероиммунотип);
- гемадсорбирующий аттенуированный штамм Ставрополь 01/08 на уровне 33 пассажа в перевиваемой культуре клеток А₄С₂/9к (VIII сероиммунотип).

При использовании тест-системы получены следующие результаты:

- пробы сывороток крови или органов регистрировали как положительные по наличию на иммунострипе одной полосы коричневого цвета;
- антитела к белку р30 определяли в пробах сывороток крови, полученных, начиная с 8–10 суток после внутримышечной инокуляции животным аттенуированных штаммов вируса АЧС, независимо от их сероиммунотиповой принадлежности и способности индуцировать гемадсорбцию;
- время анализа при комнатной температуре составляло не более 3 часов при исследовании до 30 проб сывороток одним сотрудником. Для исследования 40–60 проб одному сотруднику требовалось 4–5 часов;
- минимальное количество исследуемых проб от 1 до 10;
- срок хранения тест-системы составляет 12 месяцев.

Не удалось выявить антитела в пробе сыворотки крови свиньи, которой инокулировали гемадсорбирующий вирулентный штамм Л-57 (I сероиммунотип), в связи с гибелью животного от острой формы АЧС на 8 сутки, что согласуется с данными A.L. Reis et al. (2007), которые показали, что при сверхострой и острой формах выявление вирусоспецифических антител возможно только в пробах селезенки, так как специфические антителопродуцирующие клетки и, следовательно, антитела появляются там на 2–3 сутки после инфицирования, в то время как животные гибнут уже на 3–7 сутки [6].

Оценку аналитической чувствительности тест-системы производили на основании сравнения результатов исследования раститрованных положительных сывороток крови (двухкратные разведения) методом иммуноблоттинга и в РНИФ. Пределом чувствительности считали последнее разведение, при котором регистрировали положительный результат. Из исследованных 13 проб сывороток крови титры антител, определяемые методом иммуноблоттинга, превышали таковые по результатам РНИФ в 10 пробах, в 2 – совпадали, в 1 – были ниже. Максимальные значения титров антител в пробах сывороток крови инфицированных свиней в иммуноблоттинге достигали 1:2048.

С использованием тест-системы были исследованы 10% суспензии проб органов домашней свиньи, которой внутримышечно инокулировали аттенуированный штамм Ставрополь 01/08 на уровне 33 пассажа в перевиваемой

культуре клеток А₄С₂/9к и через 21 сутки вводили вирулентный штамм Ставрополь 01/08 (убой на 38 сутки), и дикого кабана, которому внутримышечно инокулировали аттенуированный штамм МК-200 (убой на 25 сутки). У обоих животных максимальные титры антител к белку р30 были обнаружены в лимфоузлах (1:32), легких и селезенке (1:8–1:32).

В целом было отмечено соответствие результатов исследования титрования проб сывороток методом иммуноблоттинга и в РНИФ. Преимуществом метода иммуноблоттинга было отсутствие потребности в сложном техническом оборудовании. В дальнейшем планируется проведение более масштабных исследований для валидации и лицензирования тест-системы для серодиагностики АЧС методом иммуноблоттинга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты экспериментов свидетельствуют, что разработанная тест-система может быть использована для серодиагностики и мониторинга АЧС по пробам сывороток крови и органов домашних свиней и диких кабанов с хронической или бессимптомной формами АЧС. Антитела к белку р30 в сыворотках крови свиней удастся выявить, начиная с 8–10 суток после их инфицирования слабовирулентными и авирулентными штаммами вируса АЧС. По специфичности и аналитической чувствительности тест-система не уступает РНИФ.

Работа выполнена согласно государственному контракту с Министерством образования и науки Российской Федерации № 14.М04.12.0010 от «27» июня 2014 г. в ходе реализации Межгосударственной целевой программы ЕвразЭС «Инновационные биотехнологии» в рамках НИР «Создание тест-системы для серодиагностики африканской чумы свиней».

ЛИТЕРАТУРА

1 Середа, А.Д. Белки вируса африканской чумы свиней/ А.Д. Середа, Д.В. Колбасов// Научный журнал КубГАУ.– 2012.– № 77(03).– С. 21–37.– 0421200012/0181.– Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2012/03/pdf/48.pdf>.

2 Тест-система для экспресс-диагностики африканской чумы свиней методом иммуноблоттинга с использованием рекомбинантного белка р30/А.С. Казакова, А.Д. Середа, О.М. Стрижакова, С.П. Живодеров, В.М. Лыска, В.М. Балышев, Ю.П. Моргунов, И.Ю. Хухорова, Д.В. Колбасов, А.А. Гусев // Ветеринария. – 2014. – № 9. – С. 52–56.

3 Immunoblotting OIE for Serological Diagnosis of African Swine Fever (SOP/ CISA/ASF/IB/1/2008) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://asf-referencelab.info/asf/images/files/SOPs/SOP-AFSIB12008.pdf>. – Загл. с экрана.

4 Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). Chapter 2.8.1. African swine fever/ Office International des Epizooties.– Paris, France, 2008. – 6th ed. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.08.01-ASF.pdf. – Загл. с экрана.

5 Serodiagnosis of African swine fever using the recombinant protein p30 expressed in insect larvae/ M.G. Barderas, A. Wigdorovit, F. Merelo, F. Beitia, C. Alonso, M.V. Borca, J.M. Escribano// Journal of Virological Methods.–2000. – Vol. 89, №1–2. – P. 129–136.

6 Systematic analysis with African swine fever virus/ A.L. Reis, R.M. Parkhouse, A.R. Penedos, C. Martins, A. Leitro// Journal of General Virology.–2007.–Vol. 88.– № 9. – P.2426–2434.

УДК 619:578.827.1:636.2

**ТАКСОНОМИЯ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
ПАПИЛЛОМАВИРУСОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

И.М. БАРЫКИНА, Н.А. КУЗНЕЦОВ

УО «Гродненский государственный аграрный университет», г. Гродно, РБ

Поступила в редакцию 03.08.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Папилломатоз крупного рогатого скота – инфекционное заболевание, вызываемое вирусом семейства Папилломавиридэ (*Papillomaviridae*), характеризующееся образованием бородавок на коже и слизистой оболочке [1,2,3].

Папилломатоз крупного рогатого скота распространён повсеместно и может принимать форму эпизоотий. По данным Терехова и Целищева, папилломатоз по частоте поражения животных заболеваниями опухолевой природы занимает второе место (около 14%), уступая лишь лейкозу (до 70%). В Турции при обследовании 865 голов Голштинской породы папилломатоз был диагностирован у 82 голов (9,5%); при этом из них 54,9% приходилось на мужские особи. Размер папиллом колебался в пределах 0,5–11 см. По данным Египетских исследователей, заболеваемость папилломатозом составляет 4,86%; поражение женских особей выше, чем мужских на 1,12% [1].

В отечественной литературе, встречаются данные о распространении папилломатоза в Гродненской, Брестской и Витебской областях. При обследовании 731 дойной коровы в Гродненской и Брестской областях у 15,87% на сосках вымени были обнаружены папилломы. По отдельным фермам число поражённых животных находилось в пределах 3,03 – 28,52% от общего количества обследованных животных. В ходе исследований авторы выявили 40 коров, больных клиническим маститом (5,47% от общего количества дойных

коров), и у 17,5% больных животных на сосках были обнаружены папилломы [1].

Папилломатоз характеризуется существенным экономическим ущербом, который складывается из снижения молочной продуктивности, качества спермы и скорости роста животных; уменьшения стоимости молодняка из-за пороков экстерьера; преждевременной выбраковки животных; увеличения потерь живой массы, затрат на проведение ветеринарных мероприятий и трудозатрат на дополнительную фиксацию во время доения и получения спермы; потерь мясной продукции вследствие выбраковки поражённых опухолями туш или их частей [1].

Цель исследования – на основании доступных источников литературы изучить таксономию и генетические особенности папилломавирусной инфекции крупного рогатого скота.

Материал исследования: учебные пособия; публикации в научно-практических журналах, сборниках конференций; авторефераты, диссертации.

Методы исследования: составление библиографии, реферирование, конспектирование, цитирование, аннотирование; теоретический анализ; индуктивный и дедуктивный методы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Согласно последнему пересмотру классификации Международным комитетом по таксономии вирусов все вирусы папилломы относятся к семейству *Papillomaviridae* и объединены в 12 родов, обозначаемых греческими буквами. Внутривидовая классификация, основанная на различии нуклеотидной последовательности генома вируса, делит представителей родов на виды (обозначаются греческой буквой рода и арабской цифрой) и типы (обозначаются арабскими цифрами) [2, 3].

Семейство включает следующие виды (рисунок 1):

HPV (*human papillomavirus*) – вирус папилломы человека;

BVP (*bovin papillomavirus*) – крупного рогатого скота;

CPVs (*canies papillomavirus*) – собак;

ChPV1 (*capra hircus papillomavirus*) – коз;

EcPVs (*equus caballus papillomavirus*) – лошадей;

FdPV (*felis domesticus papillomavirus*) – кошек;

OaPV (*ovis aries papillomavirus*) – овец;

SsPV1 (*sus scofa papillomavirus*) – свиней;

PsPV (*Phocoena spinipinnis papillomavirus*) – семейство китовых;

FcPV (*Fringilla coelebs papillomavirus*) – птиц;

ChPV (*Chaf-finch papillomavirus*) – птиц;

PePV (*Psittacus erithacus timneh papillomavirus*) – птиц;

MNPV (*Mastomys natalensis papillomavirus*) – грызунов;

HaOPV (*Hamster oral papillomavirus*) – хомяков;

CRPV (*Cottontail rabbit papillomavirus*) – кроликов;

ROPV (*Rabbit oral papillomavirus*) – кроликов.

Типирование папилломавирусов основано на ДНК-гомологии в соответствии с последовательностью нуклеотидов, где каждый тип более чем на 10% отличается от ближайшего генетического родственника. Типы папил-

ломавирусов пронумерованы в порядке идентификации. В пределах каждого типа имеются подтипы, которые отличаются на 2–10%, и варианты, отличающиеся только на 1–2% [3,4].

К настоящему времени известно 12 видов папилломавирусов крупного рогатого скота (BPV), которые объединены в три рода:

Deltapapillomavirus – BVP-1, -2;

Epsilonpapillomavirus – BVP-5, -8;

Xipapillomavirus – BPV-3, -4, -6, -9, -10, -11 и -12.

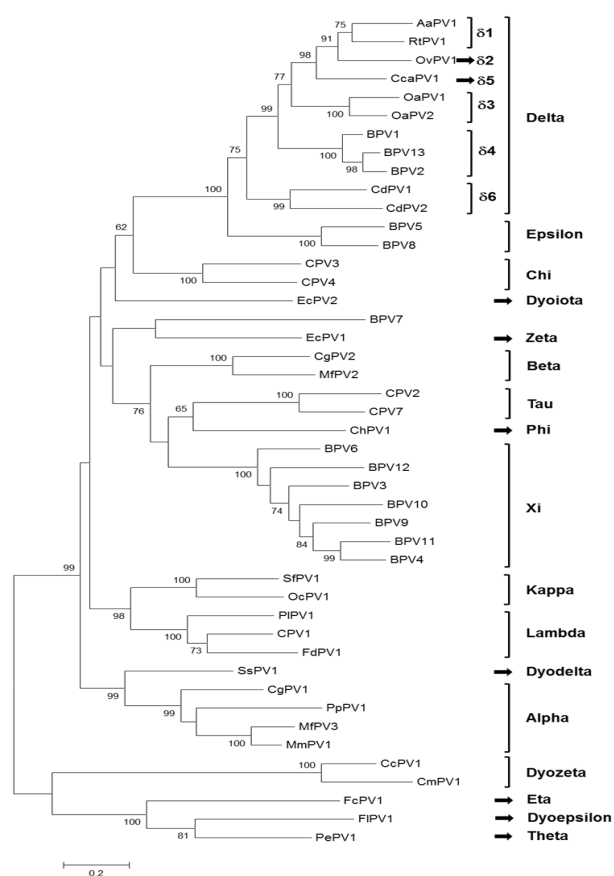


Рисунок 1 –
Филогенетическое
древо семейства
Papillomaviridae

BPV-1 выделен из фибропапиллом сосков вымени и полового члена; BPV-2 – из кожных бородавок, алиментарных фибропапиллом, опухолей мочевого пузыря; BPV-3,8 – причина кожных папиллом; BPV-4 вызывает эпителиальные папилломы в верхних отделах ЖКТ; BPV-5 индуцирует фибропапилломы вымени. BPV-6 является причиной папиллом на сосках вымени. BPV-9,10 выделены из эпителиальных плоскостеночных папиллом вымени [3, 4, 5].

Геном папилломавирусов представлен двуспиральной кольцевидно скрученной ДНК, включает около 8000 основных пар и кодирует всего 8 открытых рамок считывания (рисунок 2) [4].

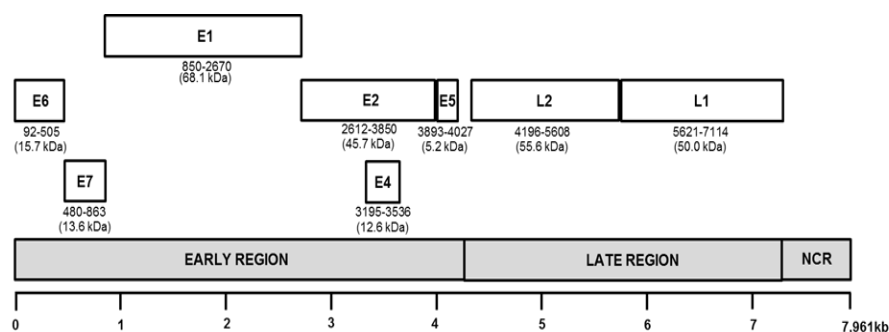


Рисунок 2 – Геном папилломавируса крупного рогатого скота

В процессе репликационного цикла геном вируса экспрессирует от 8 до 10 белковых продуктов. Ранние белки (early), контролирующие репликацию вируса, транскрипцию и клеточную трансформацию, кодируются онкопротеинами E6 и E7. Поздние белки (late) L1 и L2 кодируют структурные белки вириона. Белок L1 формирует капсомеры. Белки E1 и E2 регулируют репликацию вирусной ДНК и экспрессию генов. Онкогены E6 и E7 всегда выявляются в опухолевых клетках заражённых папилломавирусами, в то время как другие фрагменты вирусного генома могут быть утрачены в процессе его длительной персистенции. В инфицированных эпителиальных клетках на начальных стадиях вирусный генетический материал персистирует в эписомальной форме, при этом клетка способна продуцировать вирусные частицы. На более поздних стадиях геном вируса интегрирует в клеточный геном, и способность к репродукции вируса утрачивается. Интеграция вирусной ДНК в клеточную может индуцировать несколько важных событий. Во-первых, она часто сопровождается потерей вирусного материала, при этом обязательно обеспечивается сохранение генов E6 и E7; во-вторых, независимо от делеций вирусный геном в интегрированной форме не способен к полной репликации; в-третьих, индуцируется нестабильность клеточного генома. При интеграции вирусного генома в клеточный не только сохраняется транскрипция вирусных генов, прежде всего E6 и E7, но и активируется транскрипция некоторых клеточных генов. Белки E6 и E7 могут инактивировать белки-супрессоры опухолевого роста p53 и pRb105

соответственно. Кроме того, указанные онкобелки влияют на некоторые белки-циклины и циклин-зависимые киназы, являющиеся регуляторами цикла деления клетки [5,6]. Принято выделять следующие этапы инфекционного процесса, обусловленного папилломавирусами:

- первичная инфекция;
- персистенция вирусного генома в эписомальной форме с продукцией вирусных частиц;
- поликлональная интеграция вирусной ДНК в геном эпителиальной клетки;
- индукция мутаций в клеточной ДНК, вызывающая нестабильность генома;
- селекция клона клеток с мутагенной ДНК, содержащей интегрированную вирусную ДНК;
- активное размножение данного клона клеток и рост опухоли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, анализ доступных источников литературы показал, что структурные особенности папилломавирусов изучены достаточно полно, а знание геномной организации папилломавирусов позволит изучить механизмы канцерогенного действия папилломавирусов и в будущем может дать ключ к разгадке проблемы вирусного канцерогенеза в целом.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Барыкина, И.М. Папилломатоз крупного рогатого скота: распространение и морфологические изменения / И.М. Барыкина, А.В. Башура, Н.А. Кузнецов // *Наше сельское хозяйство: журнал настоящего хозяина*. – 2014. – №14. – С.10–14.
- 2 Co-infection of bovine papillomavirus type-1 and -10 in teat warts of dairy cattle / P. Kumar etc. // *Veterinari Medicina* – 2013. – №58 (12). – P.605–608.
- 3 Resendes A., Association of bovine papillomavirus type 2 (BPV-2) and urinary bladder tumours in cattle from the Azores archipelago / A. Resendes etc. // *Research in Veterinary Science* – 2011. – №9. – P.526–529.
- 4 Classification of papillomaviruses / Ethel-Michele de Villiers et all // *Virology* – 2004. – №324. – P.17–27.
- 5 Recent insights into Bovine Papillomavirus / Freitas A. C. et all // *African Journal of Microbiology Research* – 2011. – №5 (33). – P.6004–6012.
- 6 Хансон, К.П. Современные представления о канцерогенезе шейки матки / К.П. Хансон, Е.Н. Имянитов // *Практическая онкология* – 2002. – Т.3. – №3. – С.145–155.

УДК 619:616.98:579.843.95-02-084:636.93

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВОЙ ФРАКЦИИ АНТИГЕНА
BORDETELLA BRONCHISEPTICA, ОБЛАДАЮЩЕЙ НАИБОЛЕЕ
ВЫСОКОЙ ИММУНОГЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

Е.Г. ФИНОГЕНОВА, А.Ю. ФИНОГЕНОВ, М.М. МИСТЕЙКО,
И.В. ГОЛОВАЧЁВА, Н.А. ГЕЛЕЙША

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

Поступила в редакцию 25.06.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

В современном свиноводстве до сих пор является острой проблема заболеваний молодняка инфекционной этиологии с поражением пищеварительной и дыхательной систем [1]. Респираторные болезни свиней бактериальной этиологии продолжают наносить ощутимый экономический ущерб, который складывается из отхода поросят, недостижении товарных кондиций, выбраковки легких, затрат на проведение лечебных и профилактических мероприятий и низкой эффективности использования корма. Увеличению ущерба от заболеваний, вызываемых условно-патогенной микрофлорой, способствует их недостаточная изученность и неразвитая система диагностики.

Одним из недостаточно изученных возбудителей бактериальной этиологии у свиней является *Bordetella bronchiseptica*. Данный вид микроорганизма в качестве возбудителя заболевания стал изучаться сравнительно недавно [5]. В зарубежной научной литературе появляется все больше сообщений о распространении бордетеллезной инфекции. Актуальность изучения данного заболевания обусловлена еще и тем, что *Bordetella bronchiseptica* может являться причиной инфекционных заболеваний и у людей. В свиноводстве особую опасность представляет сочетанная инфекция возбудителей бордетеллеза и пастереллеза (инфекционный атрофический ринит свиней) [2]. При инфекционном атрофическом рините в период острого заболевания летальность достигает 1–5% поросят-отъемышей, в период хронического заболевания – 1%. Эффективность использования кормов – 0,1–0,2, время откорма до убойной кондиции увеличивается на 4–15 дней [4].

Основой профилактики бордетеллеза свиней, как и других инфекционных заболеваний, является проведение вакцинации. Эффективность вакцинации во многом зависит от применяемой вакцины, в том числе и от входящих в ее состав антигенов [3]. Применяемые вакцины должны обладать высокой иммуногенностью, быть ареактогенными с минимальным риском возникновения поствакцинальных осложнений. Иммуногенность вакцины во многом обусловлена входящими в ее состав антигенами, при этом вакцинный штамм должен обладать высокими иммуногенными свойствами. Реактогенность вакцины зависит от входящих в ее состав компонентов. Использование в качестве антигена цельных клеток бактерий совместно с питательной средой, на которой их культивировали, нередко приводит к высокой реактогенности и развитию поствакцинальных осложнений, так как данные вакцины содер-

жат большое количество белка питательной среды. Для снижения реактогенности применяют различные методы очистки антигена от культуральной среды. Такие высокоочищенные вакцины обладают меньшей реактогенностью, но все еще могут вызвать осложнения, поскольку в состав клетки *Bordetella bronchiseptica* входит множество антигенов, из которых только некоторые участвуют в развитии иммунного ответа, а остальные являются балластом и повышают вероятность развития аллергических реакций. Выявление белковой фракции антигена *Bordetella bronchiseptica*, которая обладает наибольшей иммуногенной активностью, разработка методов разрушения бактериальной клетки и отделения необходимой фракции позволит создать вакцину, обладающую высокой иммуногенностью и ареактогенностью.

Исходя из вышеизложенного, целью нашей работы являлась разработка и апробирование методов получения и очистки антигена *Bordetella bronchiseptica*, обладающего высокими иммуногенными свойствами и предназначенного для составления субъединичной вакцины против бордетеллеза и атрофического ринита свиней.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе был использован вакцинный штамм *Bordetella bronchiseptica* КМИЭВ-В120, выделенный нами из легочной ткани поросенка, больного пневмонией и депонированный в коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского».

Проведенную работу можно разделить на два этапа. На первом этапе было проведено разрушение бактериальной клетки и выделение белковых фракций с различной молекулярной массой. На втором этапе проводилось определение иммуногенной активности полученных белковых фракций.

Этап 1. Проведение работы по первому этапу осуществлялось последовательно:

- 1 Наращивание бакмассы штамма КМИЭВ-В120 *Bordetella bronchiseptica*.
- 2 Очистка бакмассы от питательной среды.
- 3 Инактивация полученной бакмассы.
- 4 Разрушение бактериальных клеток с использованием ультразвука.
- 5 Освобождение полученного интеграта от клеточных оболочек.
- 6 Разделение белков штамма *Bordetella bronchiseptica* по молекулярной массе с использованием фильтров.
- 7 Замер объема и содержания общего белка в каждой полученной фракции.

1 Наращивание бактериальной массы штамма проводили путем посева раскладки, полученной из лиофильно высушенного штамма на агар Хоттингера. Инкубацию проводили при температуре 37–38⁰С в течение 16–18 часов. Смыв культуры с поверхности агара осуществляли забуференным физиологическим раствором (рН 7,2–7,4) с содержанием 0,5% раствора формалина.

2 Полученную бактериальную массу очищали от остатков среды путем центрифугирования. Для этого полученный смыв разливали в центрифужные стаканы и центрифугировали при 6000 оборотов/минуту 30 минут. Надосадок сливали, а осадок, содержащий микробные клетки, разводили в забуференном физиологическом растворе (рН 7,2–7,4) с содержанием 0,5%

раствора формалина, который вносили до первоначального объема.

Таким образом, была получена очищенная от питательной среды бактериальная масса.

3 После получения очищенной от питательной среды бактериальной массы была проведена ее инаktivация. Инаktivацию проводили 0,5% раствором формалина при температуре 37⁰С на протяжении 72 часов. Контроль полноты инаktivации осуществляли путем посева антигена на МПА, МПБ, агар Сабуро и среду Кита-Тароцци. При отсутствии роста инаktivацию считали полной.

4 В специальный свинцовый стакан вносили инаktivированный антиген, опускали в него металлический стержень, герметично закрывали и подавали ультразвук при частоте 1–1,3 мГц. Двукратно повторяли следующий цикл: четыре раза проводили ультразвук по 10 минут с 5-минутным перерывом.

Контроль разрушения антигена проводили при микроскопировании мазков, приготовленных после ультразвукового разрушения. При микроскопировании оценивали степень разрушения клеточной стенки, процент неразрушенных клеток в поле зрения микроскопа. Воздействие ультразвука прекращали, когда процент полностью разрушенных клеток был максимальным.

5 После окончания ультразвукового разрушения клеток проводили центрифугирование раствора антигена с целью осаждения разрушенных «кусков» клеток. Центрифугирование проводили при 2500 об/мин 15 минут. Полученный надосадок сливали в отдельный стерильный флакон, осадок удаляли. В полученном надосадке измеряли концентрацию общего белка биуретовым методом на автоматическом биохимическом анализаторе Автолайзер.

6 В работе были использованы центрифужные фильтры для концентрации и разделения биологических растворов «Amicon Ultra» производства фирмы Millipore. Использованные фильтры и отделенные фракции приведены в таблице 1.

При проведении ультрафильтрации полученный антиген вначале вносили в центрифужный фильтр на 100 кДа. Заправленный фильтр центрифугировали при 3000 об/мин 20 минут. После окончания центрифугирования объем антигена, который остался над фильтром, переносили в стакан с подписью более 100 кДа и откладывали для дальнейших опытов, а тот объем, который профильтровался, в центрифужный стакан переносили в емкость с подписью менее 100 кДа и подвергали дальнейшему фильтрованию. Так проводили последовательное отделение фракций до последнего фильтра.

Таблица 1 – Используемые фильтры

Используемый фильтр	Величина отделяемой фракции
3 кДа	менее 3 кДа, 3–10 кДа
10 кДа	11–30 кДа
30 кДа	31–50 кДа
50 кДа	51–100 кДа
100 кДа	более 100 кДа

7 После получения 6 фракций антигена с различной молекулярной массой было проведено определение объема и содержания общего белка в каждой фракции. Определение общего белка проводили на биохимическом анализаторе DIALAB согласно инструкции к прибору с использованием биохимического набора производства CORMEY. Полученные фракции были пронумерованы и подготовлены для проведения опыта на животных.

Этап 2. После получения различных фракций антигена было проведено определение антигенной активности каждой из фракций. Определение антигенной активности проводили путем иммунизации мышей каждой фракцией и определения титра антител в сыворотки крови мышей.

Перед иммунизацией мышей проведено смешивание каждой из полученных фракций с адьювантом – гель гидроокиси алюминия (ГОВА). Для проведения иммунизации было сформировано 6 групп белых мышей массой 18–20 г. Группы мышей были сформированы по принципу аналогов. Мышей первых пяти групп иммунизировали полученными фракциями бордетеллы, мыши 6 группы служили контролем. В каждой группе находилось по 6 голов. Мышам каждой из опытных групп вводили соответствующую фракцию антигена внутримышечно однократно в объеме 0,3 мл.

После проведения иммунизации вели наблюдение за клиническим состоянием мышей. Через 21 день после заражения мышей проводили от животных всех групп отбор крови и отделение сыворотки. В полученной сыворотке определяли титр специфических антител к *Bordetella bronchiseptica* в реакции агглютинации. По величине титра антител судили об иммуногенности каждой из фракций антигена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

После разделения полученного дезинтеграта антигена *Bordetella bronchiseptica* на фракции было выделено 4 фракции: более 100 кДа, 50–100 кДа, 30–50 кДа, 10–30 кДа.

Последние 2 фракции с использованием центрифужного фильтра на 3 кДа не получились в виду того, что после отделения фракции на фильтре 10 кДа не отделилась фракция менее 10 кДа. Объем полученных фракций и содержание в них общего белка приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Объем и содержание общего белка в разных фракциях

Название фракции	Объем, мл	Содержание общего белка, г/л
Фракция более 100 кДа	10	5,35
Фракция 50–100 кДа	7	5,38
Фракция 30–50 кДа	5	0,8
Фракция 10–30 кДа	3	1,07

После проведения иммунизации мышей полученными фракциями и получения гипериммунной сыворотки был определен во всех полученных сыворотках титр специфических антител к *Bordetella bronchiseptica* в реакции агглютинации. Результаты проведенного исследования представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты опыта по определению титра антител

№ мыши	Опытные группы					Контрольная
	1	2	3	4	5	
	Фракция антигена, кДа					
	цельно-клеточный	Более 100	50–100	30–50	10–30	
	Титр антител					
1	1:64	1:32	1:32	0	0	0
2	1:64	1:32	1:8	0	0	0
3	1:64	1:32	1:16	0	0	0
4	1:64	1:32	1:32	0	0	0
5	1:64	1:32	1:8	0	0	0
6	1:128	1:64	1:16	0	0	0
среднее	1:74,7	1:37,3	1:18,6	0	0	0
+/-	10,67	5,3	4,4	0	0	0

Как видно из таблицы 3, наиболее высокий титр антител 1:74,7±10,67 получен в 1 группе мышей, которым вводился цельноклеточный антиген. Также высокий титр антител 1:37,3±5,3 был получен во второй группе мышей, которым вводилась фракция антигена более 100 кДа, что в 2 раза ниже, чем в первой группе. В 3 группе мышей, которым вводилась фракция антигена 50–100 кДа, титр антител был еще ниже и составил 1:18,6±4,4, что в 2 раза ниже, чем во 2 группе. В данной группе у 4 животных из 6 также отмечен защитный титр антител. В 4 и 5 опытной и 6 контрольной группах в сыворотке крови антител к *Bordetella bronchiseptica* не обнаружено. Это говорит о том, что фракции антигена 30–50 кДа и 10–30 кДа не являются антигенными (рисунок 1).

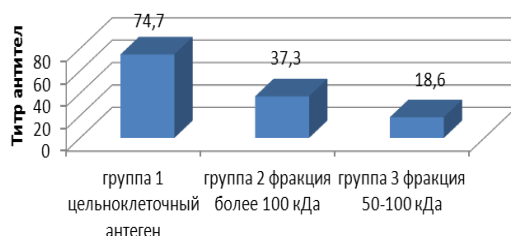


Рисунок 1 – Титр антител в опытных группах мышей

Обобщая полученные результаты, можно сделать вывод, что фракции антигена *Bordetella bronchiseptica* 30–50 кДа и 10–30 кДа не являются антигенными и не пригодны для изготовления вакцины против бордетеллеза свиней.

Фракция антигена *Bordetella bronchiseptica* 50–100 кДа формирует у 67% животных достаточно высокий титр антител. Фракция антигена *Bordetella bronchiseptica* более 100 кДа является антигенной и обеспечивает у всех животных формирование защитного титра антител и таким образом является пригодной для изготовления вакцин. Цельноклеточный антиген *Bordetella bronchiseptica* способствует формированию наиболее высокого титра антител у мышей, но поскольку цельноклеточный антиген также является наиболее реактогенным, вполне обоснованным является использование его фракции более 100 кДа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для изготовления вакцины против бордетеллеза свиней могут быть использованы фракции цельноклеточного антигена, более 100 кДа и 50–100 кДа поскольку данные фракции обладают антигенными свойствами. Фракции антигена 30–50 кДа и 10–30 кДа не являются иммуногенными. При использовании цельноклеточного антигена у животных получен титр антител $1:74,7 \pm 10,67$, при использовании фракции более 100 кДа – $1:37,3 \pm 5,3$, что в 2 раза ниже, при использовании фракции 50–100 кДа – $1:18,6 \pm 4,4$, что еще в 2 раза ниже. Поскольку цельноклеточный антиген кроме высоких иммуногенных свойств обладает также высокой реактогенностью, оптимальным при производстве вакцин является использование фракции более 100 кДа.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Карева, Э.П. Инфекционные болезни свиней с респираторным синдромом и их профилактика / Э.П. Карева, Е.А. Бокун, Н.Г. [и др.] // Проблемы, задачи и пути научного обеспечения приоритетного национального проекта «Развитие АПК»: материалы Всероссийской научно-практической конференции. – Новочеркасск, 2008. – С. 65–70.
- 2 Коритняк, М. В. Патогенез и клинические признаки бордетеллеза [Текст] / М. В. Коритняк [и др.] // Современ. развитие АПК: регионал. опыт, пробл., перспективы : материалы Всерос. науч.- практ. конф., 26–28 апр. 2005 г. – Ч.4,5/ ФГОУ ВПО «Ульяновская ГСХА». – Ульяновск, 2005. – С. 179–187.
- 3 Коритняк, М.В. Лечение и профилактика бордетеллеза [Текст] / М. В. Коритняк [и др.] // Современ. развитие АПК: регионал. опыт, пробл., перспективы: материалы Всерос. науч.- практ. конф., 26–28 апр. 2005 г. – Ч.4,5/ ФГОУ ВПО – «Ульяновская ГСХА». – Ульяновск, 2005. – С. 187–197.
- 4 Коритняк, Б. *Bordetella Bronchis* [Текст] / Б. Коритняк, М. Коритняк, Д. Сверкалова // Ветеринария с-х. животных. – 2008. – №12. – С. 22–25.
- 5 Скородумов, Д.И. Микробиологическая диагностика бордетеллеза [Текст] / Д. И. Скородумов // Ветеринария с-х. животных. – 2008. – №2. – С.22–25.

УДК 575.11:595.773.4

НЕПРОЦЕССИРУЮЩИЙ СТРУКТУРНЫЙ ПОЛИПРОТЕИН РЕТРОВИРУСА *GYP*SY КАК ПРОТОТИП ДЛЯ СОЗДАНИЯ ГЛОБУЛЯРНЫХ НАНОЧАСТИЦ

Б.В. СЁМИН¹, Я.С. КЕРУЧЕНЬКО², И.Д. КЕРУЧЕНЬКО²,
Т.А. ТРЕНДЕЛЕВА², О.Г. ЛЕОНОВА³, В.И. ПОПЕНКО³, Ю.В. ИЛЬИН³

¹ ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический
институт биологической промышленности», г. Щелково, РФ

² Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, г. Москва, РФ

³ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
г. Москва, РФ

Поступила в редакцию 10.07.2015 г.

В статье суммируется опыт многолетней работы по обнаружению и анализу функциональных мотивов аминокислотных остатков в «непроцессирующих» структурных белках ретровирусов (Gag). Теоретически и экспериментально было выяснено, какие домены аминокислотной последовательности ответственны за способность этого типа структурного белка мультимеризоваться в вирусоподобную частицу. Прояснение этого вопроса важно для понимания того, каким образом несходные первичные последовательности белков могут определять их тождественные функции. Кроме того, цикл исследований позволил обосновать алгоритмы создания искусственных белков, состоящих из минимального набора аминокислотных остатков, которые способны мультимеризоваться в белковые глобулярные наночастицы при экспрессии в гетерологичных системах. Причём, гетерологичные пептиды, подшитые к таким «минимальным» белкам экспонируются на поверхности образованных частиц.

Основное внимание в исследованиях было уделено структурному белку (Gag) ретровируса *gypsy* [1]. Особенность Gag *gypsy* заключается в том, что его аминокислотная последовательность не содержит известных канонических мотивов, характерных для Gag всех подсемейств ретровирусов: лентивирусов, онковирусов и спумавирусов. Более того, нет свидетельств, позволяющих предполагать, что Gag *gypsy* процессируется на матриксный, капсидный и нуклеокапсидный пептиды, как это присуще структурным белкам большинства ретровирусов позвоночных [2].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для создания рекомбинантного бакуловируса, позволяющего синтез Gag *gypsy* в культурах клеток *Spodoptera frugiperda*, фрагмент ДНК, соответствующий гену gag *gypsy*, был получен из клонированной копии провируса с использованием термостабильной ДНК полимеразы Pfu. Полученную ДНК клонировали в челночный вектор pBlueBac4.5/V5-His-TOPO (Invitrogen), под полиэдриновый промотор и полученную конструкцию,

названную BG1, амплифицировали в *E. coli*. Очищенную плазмиду BG1 ко-трансфецировали в культивируемые клетки *Spodoptera frugiperda* (Sf9) совместно с фрагментированной ДНК вируса ядерного полиэдроа Ас-MNPV (бакуловируса). В результате получили рекомбинантный бакуловирус, несущий под полиэдриновым промотором полноразмерный ген *gag gypsy*. Аналогично получали делеционную форму белка, создав конструкцию BG2 [3].

Для синтеза в бактериях *Gag gypsy* и его делеционных мутантов создавали конструкции на основе векторов серии pET (Novagen). Для амплификации полученных конструкций использовали линию клеток *Escherichia coli* X1-Blue (Stratogene), а линию *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) использовали для синтеза белков. Подробное описание конструкций и методы клонирования, использованные для их изготовления, можно найти по ссылке [4]. Экспрессию конструкций проводили по методике Novagen с модификациями [5].

Были получены антитела к *Gag gypsy*. Для этого в аминокислотной последовательности белка были определены антигенные детерминанты. Были синтезированы пептиды, состоящие из 20 и 19 аминокислот, соответствующие двум из них. Оба этих пептида одновременно были использованы для иммунизации кролика. Иммуноглобулиновую фракцию из сыворотки крови кролика очищали при помощи хроматографии на белок-А-сефарозе и использовали в дальнейших иммунологических экспериментах. Связывание антител к *Gag gypsy* с фракционированными в ПААГ пептидами анализировали методом иммуноблоттинга, детектируя их по связыванию со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, по стандартной методике с использованием ECL Western blotting analysis system («Amersham»).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Особенность *Gag gypsy* заключается в том, что его аминокислотная последовательность не содержит известных канонических мотивов, характерных для *Gag* всех подсемейств ретровирусов: лентивирусов, онковирусов и спумавирусов. Более того, нет свидетельств, позволяющих предполагать, что *Gag gypsy* процессируется на матриксный, капсидный и нуклеокапсидный пептиды, как это присуще структурным белкам большинства ретровирусов позвоночных. Выделить в *Gag gypsy* соответствующие домены возможно лишь виртуально. Дополняет картину то, что в нуклеокапсидной части этого белка отсутствуют классические последовательности «цинковые пальцы» (или так называемые ССНС мотивы), обычно обеспечивающие связывание структурного белка с РНК ретровируса.

На первом этапе работы мы использовали бакуловирусную систему экспрессии для доказательства того, что структурный полипротеин (*Gag gypsy*) самостоятельно, без других белков вируса способен формировать вирусо-подобные частицы. Для этого сконструировали рекомбинантный бакуловирус, позволяющий синтезировать белок в культивируемых клетках *Spodoptera frugiperda*. Показали, что при синтезе в гетерологичных клетках этот белок мультимеризуется в глобулярные наночастицы (вирусо

-подобные частицы), имитирующие зрелый вирус. Был получен интересный результат, указывающий на то, что часть внутриклеточных частиц может транспортироваться из клетки в результате сумолирования Gag [3].

Анализ *in silico* позволил выделить в последовательности аминокислотных остатков Gag *gypsy* матриксную, капсидную и нуклеокапсидную части и выявить их необычные характеристические мотивы [6].

Был сконструирован рекомбинантный бакуловирус, позволяющий в клетках синтез Gag с отсутствующей матриксной частью белка. Анализ продемонстрировал, что отсутствие матрикса не мешает белку мультимеризоваться в вирусоподобные частицы [3].

На следующем этапе мы оценили насколько важны факторы эукариотической клетки для мультимеризации структурного белка в частицу. Для этого экспрессировали белок в бактериях. Оказалось, что Gag самодостаточен для мультимеризации в глобулярные частицы без участия каких либо факторов эукариотической клетки, поскольку, при синтезе в бактериях, способен образовывать частицы [7].

Создав несколько делеционных вариантов Gag *gypsy* и экспрессируя коллекцию мутантных белков в бактериях, мы доказали несколько технологических свойств. А именно, для образования частицы, имитирующей нативный вирус, необходима всего лишь комбинация функциональных мотивов капсидной и нуклеокапсидной части белка. В результате такого подбора можно синтезировать минимальный набор аминокислотных остатков, которые способны мультимеризоваться в белковые глобулярные наночастицы при экспрессии в гетерологичных системах, которую называем «минимальный полипептид».

При этом, мультимеризация капсидной части белка может происходить без участия нуклеокапсида, хотя последний существенно влияет на структуру образуемых частиц. Показано, что для формирования белком Gag *gypsy* однородных глобулярных частиц в гетерологичной системе важна только N-концевая часть нуклеокапсида. Добавление коротких последовательностей нуклеиновых кислот, инициирует образование частиц мономерами Gag и/или его делеционными мутантами [4].

На следующем этапе, выявив и обосновав принципы построения «минимального полипептида», мы показали, что слитый полипептид, состоящий из «минимального полипептида» и подшитого к нему гетерологичного пептида, размером до нескольких сотен аминокислотных остатков, также способен мультимеризоваться в глобулярные наночастицы. При этом гетерологичный пептид оказался экспонированным на поверхности частицы. Для этого создали плазмидную конструкцию, которая позволяет синтезировать в бактериях слитый полипептид, указанный выше.

Внедрив в гетерологичный полипептид полигистидиновый тракт, мы продемонстрировали ожидаемый результат, а именно было показано, что за счёт кластера, состоящего из 6 остатков гистидина, экспериментальный белок возможно эффективно очищать аффинной хроматографией на Ni-NTA агарозе. Принципиальный результат был достигнут демонстрацией того, что добавление Ni-NTA агарозы в осветлённый лизат бактериальных клеток после синтеза экспериментального белка позволяет собрать на ага-

розе частицы, которые образовались в результате мультимеризации синтезированного белка. Затем Ni-агарозу возможно выделить из препарата низкоскоростным центрифугированием, а затем, поместив в соответствующий буфер, отделить захваченные частицы от агарозы [8].

Таким образом, результаты показывают, что вирусоподобные частицы, сформированные из белка, содержащего гетерологичный пептид с полигистидиновым трактом возможно очищать из бактериальных лизатов без использования ультрацентрифугирования. Этот результат важен с двух позиций. Во-первых, результат демонстрирует, что пептид, содержащий полигистидиновый тракт, экспонируется на поверхности частиц, поскольку и в этом случае частицы эффективно связываются с Ni-NTA агарозой. Во-вторых, при разработке промышленной технологии производства вакцин на основе вирусоподобных частиц упразднение этапа ультрацентрифугирования при очистке наночастиц приведёт к существенной экономии и сокращению времени производства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Имеются инфекции, против которых не разработаны эффективные вакцины. Обычно, такая ситуация является следствием неспособности препаратов, претендующих быть вакциной, вызвать адекватный иммунный ответ организма. При разработке субъединичных вакцин необходимо комплексное решение двух основных проблем: (1) получать структуру белка-антигена, соответствующую его природному виду и стабильно сохранять конформацию белка после введения в организм; (2) опосредовано доставлять антиген к клеткам-мишеням для стимуляции клеточного иммунитета. В этой связи, начиная с конца 90-ых годов, в мире разрабатывают технологии получения наночастиц для производства субъединичных вакцин. Пожалуй, самое перспективное направление – это создание вакцин на основе вирусоподобных частиц. Лаборатория молекулярной биотехнологии ВНИИТИБП также принимает участие в таком развитии. В этом кратком обзоре изложены наши основные достижения в разработке технологичных вирусоподобных частиц, которые сводятся к двум основным положениям.

Во-первых, в лаборатории разработан и имеется «минимальный полипептид», способный мультимеризоваться в глобулярные вирусоподобные частицы диаметром ~ 30 нм. Этот «минимальный полипептид» мы способны синтезировать слитым с гетерологичным пептидом, который в виде протектирующего антигена будет экспонирован на поверхности частицы.

Во-вторых, разработана схема алгоритмов, позволяющая минимизировать последовательность аминокислотных остатков структурного белка практически любого вируса до «минимального полипептида» для того, чтобы полученные в результате вирусоподобные частицы безопасно имитировали вирус и экспонировали необходимый протектирующий антиген/антигены.

ЛИТЕРАТУРА

1 Syomin, B.V. *Drosophila melanogaster* endogenous retrovirus gypsy can prop-

agate in *Drosophila hydei* cells/ B.V. Syomin, L.I. Fedorova, S.A. Surkov, Ilyin, Y.V.// *Molecular and General Genetics*. 2001, 264.– 5.– P.588–594.

2 Сёмин, Б.В., Ильин, Ю.В. Эрантивирусы *Drosophila*/ Б.В. Сёмин, Ю.В. Ильин // *Генетика*. – 2003.39.–№5,– С.657–663.

3 Syomin, B., Pelisson, A., Ilyin, Y. Bucheton A. Expression of the retrovirus gypsy Gag in *Spodoptera frugiperda* cell culture with the recombinant baculovirus/ *Biochemistry&Biophysics*. 2004, 398, 5.– 310–312.

4 Syomin B.V. Effect of nucleocapsid on multimerization of gypsy structural protein Gag/ B.V. Syomin, O.G. Leonova, T.A. Trendeleva, R.A. Zviagil'skaia [et al]// *Molecular Biology*. 2012, 46(2). – 298–307.

5 Сёмин, Б.В. Казило, Н.А., Леонова О.Г., Иванова Ю.Л., Ильин Ю.В., Попенко В.И. Структуры, образуемые рекомбинантной формой белка Gag ретровируса Gypsy в бактериальных клетках / Б.В. Семин, Н.А. Казило, О.Г. Леонова [и др.]// *Доклады Академии Наук*. 2009, 417, 3.– С.1–3.

6 Сёмин, Б.В., Ильин, Ю.В. Функциональные мотивы, выявляемые в аминокислотной последовательности Gag ретровируса Gypsy / Б.В. Сёмин, Ю.В. /Ильин / *Доклады Академии Наук*. 2004, 398, 3.– С.419–421.

7 Syomin, B.V. The structural protein Gag of the gypsy retrovirus forms virus-like particles in the bacterial cell/ B.V. Syomin, L. A. Ivanova, V. I. Popenko, Yu.V. Ilyin // *Molecular Biology*. 2011, №45(3). С.517–523.

8 Сёмин, Б.В. Технология очистки рекомбинантных наночастиц из бактериальных лизатов без использования ультрацентрифугирования/ Б.В. Сёмин // *Ветеринария и кормление*. 2014,– №6. – С.50–51.

УДК: 619: 616. 995. 1

ИММУНИТЕТ И ЕГО ОСОБЕННОСТИ ПРИ ПАРАЗИТАРНЫХ БОЛЕЗНЯХ ЖИВОТНЫХ

М.В. ЯКУБОВСКИЙ, Н.Ю. ЩЕМЕЛЕВА,
В.П. ВАСИЛЬКОВА, О.П. ПАХНОЦКАЯ

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

Поступила в редакцию 26.06.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Иммунная система организма животного – одна из сложнейших и роль ее трудно переоценить, так как она защищает его от воздействия различных чужеродных агентов – микробных, вирусных, паразитарных и других.

Нормально функционирующая иммунная система обеспечивает организму животного высокий уровень защиты, а ее расстройства являются причиной ряда заболеваний. Как правило, среди патологий иммунной системы наиболее часто встречаются приобретенные вторичные иммунодефициты. Особое место среди болезней, вызывающих вторичные иммунодефициты, занимают паразитарные. Для всех паразитарных инвазий характерна иммуносупрессия, она касается как гуморального, так и клеточного ответа и имеет свои особенности. Некоторые паразиты непосредственно вызывают разрушение лимфоидных клеток, однако в большинстве случаев подавление иммунного ответа происходит путем инактивации макрофагов и Т-клеток.

Тип защитной реакции организма-хозяина зависит от локализации паразитов. Поэтому целью нашего исследования явилось изучение изменений иммунных реакций животного при внедрении различных паразитов - гельминтов и простейших и на основании полученных данных в дальнейшем применение соответствующей иммунокоррекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение иммунитета при различных паразитарных болезнях крупного рогатого скота – фасциолезе, криптоспориidioзе и ассоциативных паразитозах желудочно-кишечного тракта проводили в животноводческих хозяйствах республики и в отделе паразитологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

В опытах использовали крупный рогатый скот (дойное поголовье, молодняк, телята). Всего в опытах было использовано 315 голов крупного рогатого скота.

Инвазированность крупного рогатого скота ассоциативными нематодами желудочно-кишечного тракта определяли методом Г.А. Котельникова – В.М. Хренова, 1974. Определение яиц фасциол проводили методом

последовательных смывов. Наличие ооцист криптоспоридий в фекалиях телят – методом нативного мазка с последующей окраской по Циль-Нильсену и микроскопией.

Для оценки иммунологического статуса крупного рогатого скота определяли в крови количество эритроцитов и лейкоцитов, уровень гемоглобина по общепринятым методикам. Лейкоцитарную формулу выводили на основании подсчета 200 клеток в мазках, окрашенных по Романовскому-Гимза согласно рекомендациям А.А. Кудрявцева, Л.А. Кудрявцевой (1974).

Определение Т- и В-лимфоцитов проводили по методике Д.К. Новикова, В.И. Новиковой (1996), фагоцитарную активность нейтрофилов определяли согласно «Методическим указаниям по определению естественной резистентности и путях ее повышения у молодняка сельскохозяйственных животных» (С.С. Абрамов и др., 1989), активность лизоцима в сыворотке крови – по В.Г. Дорофейчук (1968), количество циркулирующих иммунных комплексов – по методу Ю.А. Гриневич и И.И. Алферова (1981), общий белок и белковые фракции – с помощью электрофоретической системы SEBIA, количество отдельных иммуноглобулинов – по G. Mancini et al. (1965).

Из биохимических показателей исследовали активность аспартатами-нотрансферазы (АсАт), аланинаминотрансферазы (АлАт), щелочной фосфатазы (ЩФ) и уровень билирубина на биохимическом анализаторе «CORMAY LUMEN».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установлено, что **при спонтанном заражении крупного рогатого скота фасциолами** происходит увеличение количества эозинофилов на 24,50% ($P<0,01$), фагоцитарной активности нейтрофилов – на 28,73% ($P<0,01$), циркулирующих иммунных комплексов – на 42,8% ($P<0,001$) и при этом их высокий уровень наблюдался в течение всего периода исследования на протяжении 2-х месяцев. Особо следует отметить, что увеличение в крови зараженных фасциолами животных количества циркулирующих иммунных комплексов происходит за счет накопления «малых» иммунных комплексов, образующихся при недостатке иммуноглобулинов класса G.

В дальнейшем при паразитировании фасциол отмечается угнетение показателей клеточного иммунитета: снижение Т(Е-РОК)-лимфоцитов на 59,55% ($P<0,001$) и В(ЭМ)-лимфоцитов – на 24,11% ($P<0,01$).

Изменяется соотношение белковых фракций и иммуноглобулинов: повышается содержание α_1 -глобулинов – на 47,15% ($P<0,001$) снижается содержание альбуминов на 33,36%, β -глобулинов – на 34,51% ($P<0,001$), что указывает на воспалительные и деструктивные процессы в печени. Снижается концентрация IgG на 56,60% и увеличивается содержание IgM в 2,37 раза ($P<0,001$), что также указывает на характерные особенности развития данного паразитарного заболевания, протекающего с поражением печени.

Установлено достоверно значимое увеличение активности ферментов АсАт в 3,12 раза, АлАт – в 1,95 раза, ЩФ – в 2,63 раза, повышение уровня общего билирубина в крови животных в 3 раза

($P < 0,001$), указывающее на поражение печени, следствием чего является снижение синтеза белка и детоксилирующей функции, что способствует развитию иммунного дефицита в организме.

В связи с особенностями **иммунного ответа и местом паразитирования фасциол** терапия данного паразитарного заболевания должна быть направлена в первую очередь на активизацию клеточного звена иммунитета – макрофагов, Т-клеток. Эти клетки окружают паразита, и в дальнейшем аккумулируют и выделяют ряд ферментов, разрушающих покровы фасциол, а также фиброгенные факторы, стимулирующие образование гранулематозной ткани. Поражение структуры печени и нарушение ее белоксинтезирующей функции требует применения гепатопротекторов и антиоксидантов.

Применение при фасциолеозе таких препаратов, как тималин, тетрагельминтоцид, феналзол позволяет добиться эффективности по снижению инвазии на 82,0–95%, повысить иммунитет и восстановительные процессы в печени.

При исследовании **особенностей иммунного ответа и влияния на иммунитет телят ассоциации паразитов желудочно-кишечного тракта** (стронгилят, стронгилоидов, эймерий, балантидий) установлено, что на протяжении всего периода исследований количество эозинофилов находилось на достоверно высоком уровне – в 2,36 раза выше ($P < 0,01$) по сравнению с аналогичными показателями свободных от стронгилят желудочно-кишечного тракта телят.

Количество Т-лимфоцитов было ниже в 2 раза по сравнению с аналогичными показателями интактных телят, тогда как уровень В-лимфоцитов был ниже в 2,45 раза ($P < 0,001$). При этом отмечали достоверное снижение иммуноглобулинов классов IgG и IgA в 1,32 раза ($P < 0,05$) и в 1,85 раза ($P < 0,05$), g-глобулинов – в 1,30 раза ($P < 0,01$), что указывает на значительное иммуносупрессивное воздействие ассоциативных паразитов желудочно-кишечного тракта на гуморальное звено иммунитета.

К концу проводимого исследования уровень циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови опытных телят составил $106,16 \pm 8,20$ ед.опт.пл., что в 1,76 раза ($P < 0,001$) выше аналогичных показателей в группе контроля.

Таким образом, при инвазировании ассоциацией паразитов желудочно-кишечного тракта у телят наблюдается достоверно значимая иммуносупрессия гуморального звена иммунитета, сопровождающаяся снижением белков системы комплимента, иммуноглобулинов и В-лимфоцитов, что является особенностью данного паразитарного заболевания. Это следует учитывать при подборе иммунокорректирующего лечения, направленного, в первую очередь, на активизацию реакций антителозависимой клеточной цитотоксичности, в результате которой слизистые покровы кишечника формируют особый тип иммунного ответа, обеспечиваемый секреторным IgA и сенсibilизированными лимфоцитами (В-клетки), которые секретируют комплекс цитокинов. Последние, влияя на медиаторы тучных клеток, изменяют проницаемость слизистой оболочки, обеспечивая проникновение эозинофилов, комплимента и сывороточных антител в просвет кишечника, тем самым ускоряя изгнание гельминтов.

Применение иммуномодуляторов, таких как циклоферон и альвеозан, показало значимые результаты иммунокоррекции при паразитозах желудочно-кишечного тракта телят.

При исследовании **особенностей иммунного ответа и влияния на иммунитет телят криптоспоридиозной инвазии** установлено более значительное, по сравнению с фасциолезом коров и ассоциативными паразитами желудочно-кишечного тракта телят, увеличение количества эозинофилов, которое превысило уровень интактных телят в 3,44 раза ($P<0,001$).

В лейкоцитарной формуле отмечалась нейтрофилия с регенеративным сдвигом ядра влево – процент палочкоядерных нейтрофилов увеличен на 84,4 % по сравнению с показателями интактных телят ($P<0,01$), лимфопения – на 17,4 % ($P<0,01$). Следует отметить, что лимфопения при одновременном возрастании количества лейкоцитов указывает на снижение естественной резистентности организма и тяжелое течение болезни.

Количество Т(Е-РОК)- и В(ЭМ)-лимфоцитов в крови телят, больных криптоспоридиозом, было ниже на 46,0 % ($P<0,001$) и 46,4 % ($P<0,01$) соответственно, чем в крови интактных животных, в результате чего происходит ослабление иммунной защиты организма.

В возрасте 15–21 дня с усугублением патологического процесса у телят было отмечено резкое снижение содержания общего белка за счет уменьшения числа альбуминов, β - и γ -глобулинов. Эти изменения указывают на нарушения белкового обмена, связанные с нарушением белоксинтезирующей функции печени, а также с нарушением ферментации принятого корма и процесса всасывания, когда в результате патогенного действия шизонтов и гамонтов криптоспоридий энтероциты кишечника подвергаются дегенеративным изменениям с последующей атрофией ворсинок. Также наблюдалось уменьшение содержания иммуноглобулинов класса G на 23,1 % ($P<0,05$) по сравнению с интактными животными. Достоверное увеличение концентрации иммуноглобулинов класса A в крови инвазированных телят на 55,7 % ($P<0,05$) в сравнении с показателями здоровых телят указывает на активацию иммунного ответа в слизистой кишечника.

Достоверное превышение содержания фракции α_2 -глобулинов у больных телят на 6,63 % ($P<0,05$) в сравнении с показателями интактных телят тоже указывает на альтеративные процессы.

Повышенный уровень циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови телят, больных криптоспоридиозом (максимальное достоверное увеличение в 29–35 дневном возрасте в 2,38 раза ($P<0,01$)), свидетельствует о наличии специфического взаимодействия антиген-анти-тело и снижении активности гуморального звена иммунной системы.

Таким образом, криптоспоридиоз телят вызывает наиболее значимые изменения иммунитета, сопровождающиеся снижением активности как клеточной, так и гуморальной защиты. Это объясняется, на наш взгляд, как более патогенным воздействием криптоспоридий на организм телят, так и недоразвитием иммунной системы телят раннего возраста. Лечение данного протозойного заболевания у телят с использованием иммуностимуляторов должно быть направлено на активизацию всех иммунных процессов и нор-

мализацию естественной микрофлоры кишечника.

Применение комплексного иммуностимулирующего препарата «Янсеvit» оказало положительное влияние на иммунитет телят и показало эффективность при криптоспориidioзе свыше 90%.

ВЫВОДЫ

Для фасциолеза, криптоспориidioза и ассоциативных паразитозов желудочно-кишечного тракта крупного рогатого скота характерна иммуносупрессия, которая касается как гуморального, так и клеточного ответа. Общими особенностями проявления иммунного ответа на инвазию паразитами является выраженная эозинофилия, увеличение циркулирующих иммунных комплексов, изменения в соотношении фракций белков, указывающие на развитие воспалительных и пролиферативных реакций.

Установлено, что иммунные реакции и их особенности при фасциолезе, криптоспориidioзе и ассоциативных паразитозах желудочно-кишечного тракта крупного рогатого скота зависят от морфологии и места паразитирования паразитов, а также от возраста животного.

Иммунокоррекция паразитарных болезней предполагает тщательный выбор лекарственных препаратов, направленных на стимуляцию определенного звена иммунитета.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Иммуитет и его коррекция в ветеринарной медицине / П.А. Красочко, М.В. Якубовский [и др.]; под общей ред. П.А. Красочко. – Смоленск, 2001. – 322 с.
- 2 Паразитарные зоонозы / М. В. Якубовский [и др.]; под. ред. М. В. Якубовского. – Минск: Наша Идея, 2012. – 384 с.
- 3 Щурова, Н.Ю. Иммунологические показатели у крупного рогатого скота при фасциолезе / Н.Ю. Щурова, М.В. Якубовский // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями: материалы науч. конф., Москва, 3–25 мая 2006 г. / ВИГИС, Всерос.о-ва гельминтол. Москва, 2006. – С. 449 – 451.
- 4 Якубовский, М.В. Современные проблемы иммунологии гельминтов / М.В. Якубовский, Г.Н. Чистенко, В.Н. Горюнов [и др.] // Мед. обзор. – 1991. – С.121–127.
- 5 Moreau, E. Lack of humoral and cellular responses against glutathione S-transferases in *Fasciola hepatica* experimentally infected sheep / E. Moreau, A. Chauvin, C. Boulard // Vet. Res. – 1998. – Vol.29, № 7. – P. 585– 591.

УДК 619:616.995.1:615.28

УРОВЕНЬ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЛИЧИНОК СТРОНГИЛЯТ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА К АЛЬБЕНДАЗОЛУ

Е.А. СТЕПАНОВА

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелецкого»,
г. Минск, РБ*

Поступила в редакцию 26.06.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Широкое применение противопаразитарных средств дало положительные результаты в виде повышения уровня иммунитета, сохранности животных, увеличения продуктивности, выхода молодняка, сохранения племенных качеств и другие. Однако, несмотря на это, стали все очевиднее проявляться и отрицательные стороны массового применения противопаразитарных средств.

В последнее время в мире все чаще регистрируются случаи развития резистентности паразитов к лекарственным препаратам. Остро стоит эта проблема и в паразитологии. В странах с интенсивным ведением животноводства выявлено множество случаев возникновения устойчивости к противопаразитарным препаратам у паразитарных организмов, особенно у гельминтов (США, Австралия, Германия, Франция, Англия и др.).

Под резистентностью паразитов понимается генетически наследуемая потеря чувствительности их новой популяции к препаратам, при применении которых они ранее были к ним восприимчивы.

Наиболее частые причины возникновения резистентности следующие: дегельминтизация без предварительно установленного диагноза; частое (каждые 6 месяцев и чаще), бессистемное применение антгельминтиков; постоянное использование одного и того же действующего вещества; применение антгельминтиков в дозе ниже терапевтической; применение антгельминтиков без проведения исследований по эффективности дегельминтизации.

Согласно литературным данным (Prichard R.K., 1980; M.A. Taylor, K.R. Hunt, 1989; Rohrer et al., 1994; Wiley et al., 1996; Hoekstra et al., 1997; Coles G.C., 2006 и др.) наиболее часто выявляется резистентность нематод к

препаратам из группы бензимидазолов. К производным бензимидазолов относятся: тиабендазол, мебендазол, фенбендазол, альбендазол, оксфендазол, оксбендазол, камбендазол, парбендазол, флубендазол и другие.

В связи с широким распространением случаев резистентности паразитов к действию часто применяемых химиотерапевтических препаратов сотрудниками отдела паразитологии был изучен уровень резистентности личинок стронгилят желудочно-кишечного тракта к альбендазолу в животноводческих хозяйствах республики с целью повышения эффективности применения противопаразитарных средств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Первично провели подбор оптимального растворителя для растворения альбендазола.

В качестве растворителя были испытаны растворы соляной кислоты (0,1%, 0,2%, 0,3%) и растворы ДМСО (диметилсульфоксид) (0,1%, 0,2%, 0,3%). При этом на первом этапе учитывалась скорость и степень растворения антгельминтика и влияние раствора на подвижность личинок нематод (проводили дифференцировку их как нормальные (подвижные) и парализованные (без заметного движения в течение 5 секунд).

На следующем этапе были подобраны и отработаны способы для установления степени резистентности паразитов к препаратам.

Далее провели опыты по установлению степени резистентности паразитических нематод к препаратам на материале из 4 хозяйств с периодическим применением препаратов на основе альбендазола и из 3 хозяйств, где препараты на основе альбендазола не применялись последние 3 года. Животных, спонтанно инвазированных стронгилятами желудочно-кишечного тракта, подбирали на основании гельминтооовоскопического обследования крупного рогатого скота на нематодозы по методу Г.А. Котельникова-В.М. Хренова (1974).

Для проведения опытов от крупного рогатого скота, спонтанно инвазированного стронгилятами желудочно-кишечного тракта, отобрали необходимое количество фекалий, которые культивировали в термостате (26–27°C) 8 дней, т.е. до вылупления из яиц личинок стронгилят желудочно-кишечного тракта и достижения ими инвазионной зрелости.

Для постановки тестов готовили маточный раствор альбендазола в концентрации 2000 мкг/мл на растворе соляной кислоты, а из него серию разведений с различной концентрацией препарата: 1000,0; 100,0; 10,0; 1,0; 0,1; 0,01; 0,001 мкг/мл. Во все чашки Петри вносили по 2 мл взвеси инвазионных личинок гемонхов в концентрации не менее 100 личинок в 2 мл.

Личинок выдерживали в растворах антгельминтика 24 часа при комнатной температуре. Подсчитывали все 100 личинок и дифференцировали их как нормальные (подвижные) и парализованные (без заметного движения в течение 5 секунд).

Устанавливали летальную концентрацию (ЛК₅₀) – концентрацию раствора альбендазола, которая вызывает паралич у 50% личинок гельминтов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При подборе оптимального растворителя для растворения альбендазола наилучшие результаты были получены при использовании в качестве растворителя для альбендазола 0,2% раствор соляной кислоты и 0,3% раствор ДМСО, в дальнейшем было решено использовать 0,2% раствор соляной кислоты.

Для установления степени резистентности паразитов к препаратам за основу взяли метод *in vitro* «тест паралича личинок» (ETH) (Martin P.J. and Le Jambre L.F. 1979).

При определении эффективности альбендазола против инвазионных личинок стронгилят желудочно-кишечного тракта (гемонхов) *in vitro* «тест паралича личинок» (ETH) установлено, что ингибирование всех личинок гемонхов из хозяйств, где препараты на основе альбендазола применяются периодически, произошло при концентрации альбендазола 2000 мкг/мл, а в хозяйствах, где препараты на основе альбендазола не применялись в последние 3 года, – при 100,0 мкг/мл.

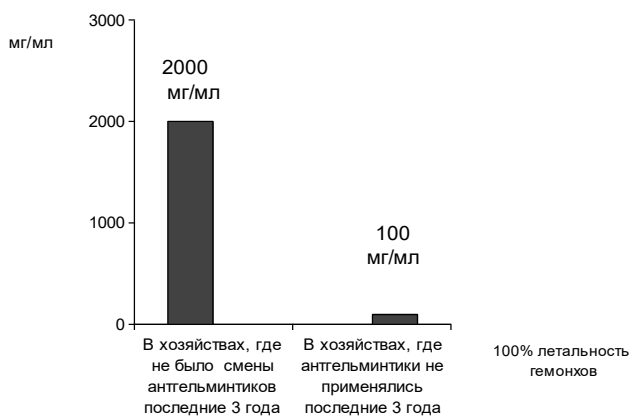


Рисунок 1 - Результаты эффективности (скрининга) альбендазола против инвазионных личинок стронгилят желудочно-кишечного тракта (гемонхов) *in vitro* «тест паралича личинок» (ETH)

Также можно отметить, что результаты полученные при испытании подобранного теста, проведенного с использованием инвазионных личинок стронгилят желудочно-кишечного тракта, позволяют утверждать, что его можно использовать для проведения первичного скрининга препаратов, титрации дозы веществ при поисках антгельминтиков, а также с целью выявления антгельминтной резистентности у паразитических нематод.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несоблюдение правил дегельминтизации (отсутствие ротации препаратов, длительное применение) приводит к снижению эффективности антгельминтных препаратов.

При установлении степени резистентности паразитических нематод к противопаразитарным препаратам установлено, что эффективность альбендазола в хозяйствах, где препараты на его основе периодически применяются, и не проводится ротация антгельминтных препаратов, была ниже в 20 раз.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Coles, G.C. Collaborating to tackle the problem of anthelmintic resistance/ Coles G.C., Jackson F., Taylor M.A., Wolstenholme A.J.// *Vet. Rec.*, 2004.–Vol.155.– P.253–254.
- 2 Craven, J. A comparison of in vitro tests and a faecal egg count reduction test in detection of anthelmintic resistance in horse strongyles/ Craven J., Bjorn H., Barnes E.H., Henriksen S.A., Nansen P.// *Vet. Parasitol.*, 1999.– Vol.85.– P. 49–59.
- 3 *Manual of veterinary parasitological laboratory techniques*// Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. 1986. HMSO, London. – P. 1–152.
- 4 Taylor, M.A. Anthelmintic resistance detection methods: a review/ Taylor M.A., Hunt K.R., Goodyear K.L.// *Vet. Parasitol.*, 2002.– Vol. 103. – P. 183–194.
- 5 Кармалиев, Р.С. Резистентность гельминтов к антгельминтикам и методы их тестирования./ Р.С. Кармалиев, А.А. Черепанов // *Ветеринария*, 1992.– № 9–12.–С. 31–34.

УДК 612.4:599.735.3

ГОРМОНАЛЬНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ЕВРОПЕЙСКОЙ КОСУЛИ В УСЛОВИЯХ ЗАПОВЕДНИКА

Д.Н. ФЕДОТОВ¹, М.П. КУЧИНСКИЙ²

¹УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная
академия ветеринарной медицины», г. Витебск, РБ

²РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского»,
г. Минск, РБ

Поступила в редакцию 06.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Европейская косуля (*Capreolus capreolus*) – самое распространенное и популярное охотничье животное. В настоящее время возросло влияние антропогенного фактора на её популяцию в северной части Республики Беларусь [3]. С учетом этого численность косуль снижается вследствие сокращения территории обитания, ухудшения кормовой базы и других причин [5].

Объективно оценить современное состояние популяции данного вида животных можно на основе результатов лабораторного исследования крови [6, 8]. Особый интерес представляют показатели белкового, липидного, ми-

нерального обменов и уровень гормонов гипофиза, щитовидной железы и надпочечников, которые в значительной мере определяют адаптивные реакции и регуляторные механизмы организма [7, 10].

Опыт ученых многих стран показывает, что при научно-обоснованном ведении охотничьего хозяйства являются весьма рентабельной отраслью [2, 4], а дикие копытные животные могут быть одним из постоянно действующих источников получения высококачественной мясной продукции [9].

Изучению биологии европейских косуль посвящено много исследований ученых, но данных по оценке состояния эндокринного статуса и обмена веществ у этих животных в возрастном аспекте в условиях обитания Республики Беларусь мы не обнаружили. С учетом этого, мы поставили цель – изучить уровень некоторых гормонов и показателей биохимического анализа крови европейской косули в возрастном аспекте, а также на фоне применения различных рационов и новых препаратов для нормализации обмена веществ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводились в 2012–2014 гг. в условиях вольеров ГПУ «Березинский биосферный заповедник». Из 24 косуль возрастом 1–2 и 3–4 года по принципу условных аналогов были сформированы контрольные и опытные группы. Животные контрольных групп получали основной рацион (ОР), который в зависимости от сезона года состоял из древесно-веточного корма, зеленой массы (люцерна, вика, клевер, донник, злаки, лесная трава), желудей, овса, сена и соли.

У косуль опытной группы 1–2-хлетнего возраста зеленая масса на 50–60% состояла из кипрея узколистного. Кроме того, им дважды в течение года внутримышечно инъектировали препарат «Е-Селен» из расчета 3 см³ на одно введение. Опытным косулям в возрасте 3–4 года к основному рациону дополнительно назначали ветви и отвар рябины, а также выпаивали 2 раза в год в течение недели препарат «Антианемин Форте» из расчета 10 мл/л питьевой воды. Кроме того, животным данной группы дважды в зимний период с интервалом 45 дней вводили внутримышечно антимиопатик 2 в дозе 4 см³ на одну инъекцию.

Все контрольные и опытные косули обрабатывались противопаразитарными препаратами, которые вносились в корма. Последние скармливались общепринятым групповым методом.

В конце опыта из яремной вены косуль каждой группы проводили взятие проб крови для биохимических и гормональных исследований.

Отлов косуль проводили сетями высотой 2,5 метра, изготовленными из прочного капронового шнура толщиной 0,4 см и размером ячеек 10×10 см.



Рисунок 1 – Отлов сетями косуль в условиях вольеров заповедника



**Рисунок 2 – Взятие крови из
яремной вены у косули**



**Рисунок 3 – Косуля опытной
группы. Возраст 2 года**

После отбора проб крови косуль идентифицировали с помощью специального маркера и отпускали.

Биохимическое исследование сыворотки крови проводили на автоматических биохимических анализаторах «CormeyLumen» и EuroLiser» (Австрия), используя диагностические наборы производства «Cormey» или «Randox» (Великобритания) и методическое сопровождение фирм-производителей оборудования и реактивов. Стандартными методами определяли содержание общего белка, альбуминов, триглицеридов, холестерина, АЛАТ, кальция, фосфора, цинка, меди, железа, магния, кобальта, витамина Е [1].

На автоматическом гамма-счетчике «WIZARD – 1470 automatic gamma counter» стандартизированными методами радиоиммунологического анализа в плазме и сыворотке крови животных выявляли уровни тиреотропного гормона, тироксина, трийодтиронина и кортизола.

При работе с наборами реагентов ИРМА-ТТГ-СТ, РИА-КОРТИЗОЛ-СТ, РИА-Т₃-СТ и РИА-Т₄-СТ соблюдались правила работы с радиоактивными веществами согласно требованиям ГН 2.6.1.8-127 и СанПиН 2.6.1.8–8.

Связанный с белком крови йод (СБЙ) определяли арсенит-цериевым методом Barker S.B., Humphrey M.J. в модификации Г.С. Степанова (1965).

Все цифровые данные, полученные при проведении экспериментальных исследований, были обработаны статистически с помощью компьютерной программы Microsoft Office Excel, критерий Стьюдента на достовер-

ность различий сравниваемых показателей оценивали по трем порогам вероятности: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ результатов биохимического исследования крови косуль показал, что содержание общего белка в возрастном аспекте в контрольной и опытной группах достоверных отличий не имело и колебалось в пределах от $71,43 \pm 2,17$ до $74,03 \pm 2,41$ г/л (таблица 1). Следует отметить, что для более взрослых животных контрольной группы характерно уменьшение уровня альбуминов в крови с $51,56 \pm 2,45$ до $49,68 \pm 1,85$ г/л. У косуль опытной группы данный показатель с возрастом повысился на 3,0%.

В отношении уровня триглицеридов в крови животных межгрупповых и возрастных особенностей не выявлено, данный показатель находился в пределах $1,02 \pm 0,11$ – $1,44 \pm 0,17$ ммоль/л.

Содержание холестерина с возрастом косуль контрольной группы достоверно увеличилось в 1,5 раза ($p < 0,05$), составив в конце опыта $4,39 \pm 0,33$ мкмоль/л. В опытной группе данный показатель, напротив, снизился с $2,79 \pm 0,09$ до $2,58 \pm 0,21$ мкмоль/л ($p > 0,05$).

Уровень одного из ферментов, инициирующего процесс дезаминирования аминокислот – аланинаминотрансфераза (АлАТ), у животных контрольной группы в возрасте 1–2 года был на 20% выше ($p < 0,05$), чем у опытных косуль. С возрастом её уровень еще возрос на 18,7%, составив при этом $41,05 \pm 6,42$ У/л ($p < 0,05$). У подопытных животных данный показатель с возрастом снизился с $26,72 \pm 7,86$ до $26,11 \pm 8,05$ У/л и был в конце опыта достоверно ($p < 0,01$) ниже, чем у контрольных косуль.

Содержание в крови косуль кальция и фосфора в возрастном аспекте и между контрольной и опытной группами достоверных отличий не имело. В отличие от этих элементов концентрация магния у животных опытных групп была достоверно ($p < 0,05$) выше, чем у контрольных.

Уровень железа в крови подопытных косуль 1–2 лет был в 1,4 раза выше ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. К 3–4 годам у контрольных животных он снизился на 32% и составил $17,48 \pm 1,55$ мкмоль/л ($p < 0,05$), а в опытной группе, напротив, повысился с $34,95 \pm 1,52$ до $38,75 \pm 0,57$ мкмоль/л и был 2,2 раза выше ($p < 0,001$), чем в контрольной группе.

Содержание кобальта в крови у контрольных и опытных животных с возрастом увеличилось соответственно в 1,4 ($p < 0,05$) и 1,7 раза ($p < 0,01$), при этом межгрупповые различия составили 17,6%.

Уровень меди в крови косуль контрольной и опытной групп существенных различий не имел, однако с возрастом увеличивался в 1,3 раза ($p < 0,05$).

Содержание цинка в крови косуль 1–2 лет в контрольной группе составило $45,60 \pm 1,71$ мкмоль/л, а в опытной – $55,24 \pm 1,94$ мкмоль/л ($p < 0,01$). В возрасте 3–4 года межгрупповые различия практически отсутствовали.

Уровень СБЙ в крови опытных животных в возрасте 1–2 и 3–4 года был выше, чем у контрольных соответственно на 4,4 и 17,8% ($p < 0,05$).

Таблица 2 – Биохимические и гормональные показатели крови у косуль

Показатели	Возраст, лет			
	1 – 2		3 – 4	
	контроль	опыт	контроль	опыт
общий белок, г/л	72,14±3,04	72,20±1,63	71,43±2,17	74,03±2,41
альбумины, г/л	51,56±2,45	50,67±4,81	49,68±1,85	52,21±2,07
триглицериды, ммоль/л	1,05±0,09	1,13±0,12	1,44±0,17	1,02±0,11
холестерин, мкмоль/л	2,94±0,27	2,79±0,09	4,39±0,33*	2,58±0,21
АлАТ, У/л	33,38±10,81	26,72±7,86*	41,05±6,42*	26,11±8,05**
кальций, ммоль/л	2,64±0,28	2,85±0,35	2,66±0,34	2,93±0,23
фосфор, моль/л	1,75±0,53	1,83±0,10	1,63±0,19	1,81±0,30
магний, ммоль/л	1,18±0,15	1,50±0,10*	1,10±0,20	1,64±0,07*
железо, мкмоль/л	25,77±2,62	34,95±1,52*	17,48±1,55*	38,75±0,57***
кобальт, мкмоль/л	0,25±0,13	0,24±0,07	0,34±0,11*	0,40±0,04**
медь, мкмоль/л	11,30±1,28	11,25±1,05	14,68±1,84*	14,93±1,42*
цинк, мкмоль/л	45,60±1,71	55,24±1,94**	50,78±1,08	51,98±1,16
СБЙ, нмоль/л	269,00±12,83	280,75±9,88	259,25±14,48	305,50±10,66*
витамин Е, мкг/мл	1,39±0,41	2,56±0,22**	1,13±0,25	2,84±0,31***
ТТГ, мМЕ/л	6,03±0,09	6,00±0,18	5,93±0,17	6,23±0,17
Т ₃ , нмоль/л	4,15±0,68	4,88±0,52	3,97±0,28	5,03±0,53
Т ₄ , нмоль/л	44,50±4,04	44,84±1,55	46,61±1,32	49,49±1,61
кортизол, нмоль/л	395,25±7,37	389,50±13,63	363,13±15,40	313,25±7,01*

Примечание – * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; по отношению к контрольной группе

Содержание витамина Е в крови 1–2-летних подопытных косуль в 1,8 раза ($p<0,01$) выше, чем контроле, а в 3–4 года – в 2,5 раза ($p<0,001$).

Уровень тиреотропного гормона (ТТГ), синтезируемого тиреотрофами передней доли гипофиза, в крови животных возрастных и межгрупповых достоверных отличий не имел, колебался в пределах от 5,93±0,17 до

6,23±0,17 мМЕ/л.

Содержание в крови косуль активного гормона щитовидной железы трийодтиронина (Т₃) в 1–2 летнем возрасте достоверных отличий между группами не имело, хотя и было несколько выше у опытных животных.

К 3–4 годам у контрольных косуль уровень Т₃ снизился до 3,97±0,28 нмоль/л, а в опытной группе несколько повысился и составил 5,03±0,53 нмоль/л.

В 1–2 и 3–4 летнем возрасте наблюдалась тенденция повышения в крови опытных животных уровня основного гормона щитовидной железы тироксина (Т₄), что указывает на более активное функционирование щитовидной железы.

Содержание кортизола, наиболее активного из глюкокортикоидных гормонов коры надпочечников, в подопытных группах косуль было ниже, чем в контрольных. В 3–4-летнем возрасте данный показатель у животных опытной группы составил 313,25±7,01 нмоль/л, что на 13,7% ниже (p<0,05), чем у косуль контрольной группы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обмен веществ представляет собой совокупность двух диаметрально противоположных, гармонически сочетающихся процессов — синтеза (анаболизма) и распада (катаболизма) веществ. Он обуславливает непрерывную связь живого организма с внешней средой. В живую клетку поступают вещества, которые затем опосредуются ею в собственные, преемственные для нее соединения. Последние, в результате метаболизма, разрушаются и выводятся в окружающую среду.

Процессы синтеза и распада протекают не хаотически, а в определенной, строго отрегулированной последовательности: распад каждой составной части клетки сопровождается формированием новой частицы, выполняющей ту же роль, ту же функцию. Поэтому каждый организм в течение жизни сохраняет присущие ему формы, химический состав и свойства.

Биохимический анализ крови играет важнейшую роль в оценке состояния организма животного, позволяет своевременно выявить и предупредить, особенно в начале развития, многие заболевания, обусловленные дефицитом биологически активных веществ.

Анализ доступной литературы показал, что данные по обмену веществ у европейских косуль в возрастном аспекте, а также в условиях обитания в Республике Беларусь отсутствуют. Впервые приводятся также результаты влияния на биохимические показатели крови данного вида животных зеленой массы кипрея узколистного, отвара рябины и новых ветеринарных препаратов: «Е-селен», «Антианемин Форте» и «Антимиопатик 2».

ВЫВОДЫ

С возрастом в крови европейских косуль, содержащихся в условиях заповедника Республики Беларусь, повышается уровень холестерина, АлАТ, кобальта, меди, цинка, Т₄ и снижается содержание железа, йода, Т₃.

Применение в рационе европейской косули зеленой массы кипрея узколистного, отвара рябины, препаратов «Е-селен», «Антианемин Форте» и «Антимиопатик 2» оказывает стимулирующее воздействие на обменные

процессы в организме, восполняя дефицит минералов и профилактирует болезни витаминно-минеральной недостаточности.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Дубина, И.Н. Методические указания по биохимическому исследованию крови животных с использованием диагностических наборов: утв. ГУВ МСХиП РБ 27.11.2007 г. / И.Н. Дубина, А.П. Курдеко, И.В. Фомченко, И.И. Смильгин. – Витебск: УО ВГАВМ, 2008. – 60 с.
- 2 Катаева, Д.Г. Ветеринарно-санитарная экспертиза мяса косуль при гельминтозах / Д.Г. Катаева // Труды Всероссийского института гельминтологии. – 2006. – Т. 44. – С. 84–90.
- 3 Каишальян, А.П. Жизнеспособность популяций копытных Березинского биосферного заповедника / А.П. Каишальян // Современные проблемы биологических исследований в Западной Сибири и на сопредельных территориях: Материалы Всероссийской научной конференции, посвященной 15-летию биологического факультета Сургутского государственного университета / редколлегия В.П.Стариков (отв. редактор) [и др.]. – Сургут: изд-во ООО «Таймер», 2011. – С. 64–67.
- 4 Плакса, С.А. Пространственное распределение и динамика численности косули в Дагестане / С.А. Плакса // Вестник охотоведения. – 2011. – № 1, т. 8. – С. 5–13.
- 5 Тышкевич, В.Е. Нерациональные потери косуль. Пути снижения смертности / В.Е. Тышкевич // Паляўнічы Беларусі. – 1997. – № 11. – С. 2–3.
- 6 Федотов, Д.Н. Гормональные и биохимические изменения в крови косуль под влиянием биоэлементов / Д.Н. Федотов // Молодежь и инновации – 2013: Материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых, Горки, 29 – 31 мая 2013 г.; в 4-х ч. – Горки: БГСХА, 2013. – Ч. 3. – С. 329 – 330.
- 7 Федотов, Д.Н. Анатомия и гистология щитовидной железы в постнатальном онтогенезе европейской косули, обитающей в северной части Беларуси / Д.Н. Федотов, М.П. Кучинский // Животноводство и ветеринарная медицина: ежеквартальный научно-практический журнал. – 2014. – № 2 (13). – С. 36–40.
- 8 Fiadotau, D.N. The age morphology of the thyroid gland of the European roe deer / D.N. Fiadotau // Proceedings of the 1st European Conference on Agriculture: «East West», June 2, Vienna, Austria, Association for Advanced Studies and Higher Education GmbH. – Vienna, 2014. – P. 57–59.
- 9 Melberg, S. Spatiotemporal competition patterns of Swedish roe deer and wild boar during the fawning season: master thesis in wildlife ecology / S. Melberg. – Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 2012. – 39 p.
- 10 Žele, D. Biochemical indicators in serum of free-ranging roe deer (*Capreolus capreolus*) in Slovenia / D. Žele, G. Vengušt // ACTA VET. BRNO. – 2012. – №81. – P. 377–381.

УДК 619:615.37.012

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ СУХОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ ПТИЦ

И.В. КОВАЛЬСКИЙ

*ФБГНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический
институт биологической промышленности», г. Щелково, РФ*

Поступила в редакцию 10.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Усовершенствование биологических препаратов, в частности, вирусных вакцин, неразрывно связано с повышением их стабильности, которая является важным фактором успешной вакцинации [1, 2]. Данные ВОЗ [3] свидетельствуют о все возрастающей потребности в стабильных вакцинах, особенно для использования их в районах, где температура окружающей среды высока и где средства обеспечения «холодовой цепи» часто ограничены.

Одним из наиболее современных и широко распространенных методов сохранения активности биологических препаратов является сублимационное высушивание, успех которого во многом определяется введением в состав исходного материала эффективного стабилизатора [4].

Одним из главных путей решения проблемы стабилизации вакцин с помощью эффективных защитных сред является понимание механизмов процессов повреждения и защиты, которые протекают в такой сложной физико-химической системе, как вакцина [4]. Новые подходы к расшифровке таких механизмов дает использование современных перспективных методов исследования системы по некоторым характеристикам ее состояния. Термодинамические активационные параметры (изменение свободной энергии, энтропия и теплота активации) определяют с помощью кинетических исследований, подвижность воды в системе – с помощью спиновых меток, калориметрии и других физических методов.

Преимущество кинетического подхода к исследованию состояния сложных систем состоит в том, что рассматриваются не только начальное и конечное состояния системы, но и скорости протекающих в ней процессов [5]. Изучение кинетики инактивации вируса при различных температурах, расчет констант скоростей, исследование и анализ зависимости константы от температуры, основанный на положениях теории абсолютных скоростей реакций Эйринга позволяет оценить изменения свободной энергии, энтропию и теплоты активации процессов инактивации вируса в зависимости от условий реакции.

Нами исследовано влияние различных стабилизаторов на величину термодинамических кинетических параметров сухой вакцины против ньюкаслской болезни (НБ) птиц.

Выбор модели обусловлен актуальностью проблемы борьбы с НБ,

которая относится к особо опасным инфекциям, распространена во всем мире, наносит большой экономический ущерб и является одной из нерешенных до конца проблем ветеринарии [6]. Специфическая профилактика НБ с помощью живых и инаktivированных вакцин является важной составной частью контроля и борьбы с НБ и осуществляется во всем мире [5].

С целью попытки объяснения возможных механизмов действия стабилизаторов в процессе замораживания-высушивания и последующего хранения сухой вакцины ее рассматривали как сложную физико-химическую систему вирусодержащий материал + защитная среда (ВСМ+ЗС), состояние которой оценивали по термодинамическим характеристикам:

ΔG^{0tt} – свободная энергия активации;
 ΔH^{0tt} – свободная энтальпия активации;
 ΔS^{0tt} – свободная энтропия активации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы образцы опытных серий вакцины против НБ, высушенной без стабилизатора (б/с), со стабилизатором обезжиренное молоко (ОМ) и с защитной средой на основе гидролизата белка (ГБ).

Термодинамические характеристики состояния системы вирус-защитная среда определяли исходя из того, что [5]:

- снижение инфекционной активности вируса НБ в сухой вакцине при воздействии повышенных температур независимо от используемых защитных сред происходит линейно и описывается кинетическим уравнением первого порядка;

- зависимость константы скорости инаktivации вируса НБ от температуры в координатах ($\ln K_T$ от $1/T$) является линейной:

$$\ln K_T = a_0 + 10^3 \cdot a_1 \cdot 1/T \quad (1)$$

и описывается уравнением Аррениуса, которое на основании общих положений теории скоростей Эйринга можно записать в виде:

$$K_T = (k_B \cdot T)/h \cdot \exp(\Delta S^{0tt}/R - \Delta H^{0tt}/RT)$$

или в логарифмической форме:

$$\ln K_T = \ln(k_B \cdot T/h) + \Delta S^{0tt}/R - \Delta H^{0tt}/RT, \text{ где} \quad (2)$$

a_0 и a_1 – коэффициенты в уравнении регрессии (1);

K_T – константа скорости инаktivации вируса при температуре T ;

T – абсолютная температура (в ° K);

ΔS^{0tt} и ΔH^{0tt} – свободная энтропия и энтальпия активации;

$k_B = 1,38 \cdot 10^{-16}$ эрг/град • моль γ постоянная Больцмана;

$h = 6,63 \cdot 10^{-27}$ эрг • сек - постоянная Планка;

$R = 1,986$ кал/град • моль - газовая постоянная;

Исходя из уравнений (1) и (2) термодинамические характеристики определяли по формулам:

$$\begin{aligned} \Delta H^{0tt} &= -a_1 \cdot R \cdot 10^3 \\ \Delta S_T^{0tt} &= a_0 \cdot R - R \cdot \ln(k_B/h) - \ln T \\ \Delta G^{0tt} &= \Delta H^{0tt} - T \cdot \Delta S^{0tt}, \text{ где} \end{aligned} \quad \begin{aligned} (3) \\ (4) \\ (5) \end{aligned}$$

K_T – константа скорости инаktivации вируса при температуре T ,

T – абсолютная температура (в ° K),

$k_B = 1,38 \cdot 10^{-16}$ эрг/град • моль – постоянная Больцмана,
 $h = 6,63 \cdot 10^{-27}$ эрг • сек – постоянная Планка,
 $R = 1,986$ кал/град • моль – газовая постоянная.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для определения титра вируса (основного параметра определения инфекционной активности вируса в вакцине) использовали реакцию гемагглютинации как результат заражения вирусом НВ куриного эмбриона. В таблице 1 представлены полученные экспериментальные данные (исходные для статистической обработки).

Таблица 1 – Исходные экспериментальные данные (для статистической обработки)

Температура	Серия 1		Серия 2		Серия 3		Серия 4	
	х	у	х	у	х	у	х	у
37 °С	0	9,25	0	8,86	0	9,5	0	9,53
	1	8,7	1	9,0	1	8,63	1	9,58
	2	8,9	3	8,5	2	9,08	2	9,08
	3	8,9	5	8,38	3	7,92	3	8,5
	5	8,5	7	8,05	4	8,13	4	8,25
	7	8,3	11	7,25	7	7,92	7	8,25
	10	7,75	14	6,75	11	7,23	11	7,5
	14	8,2			14	7,38	14	6,5
55 °С	0	9,0	0	8,86	0	9,0	0	9,53
	0,042	8,6	0	8,63	0	8,67	0,125	9,42
	0,125	8,9	0	8,25	0	8,83	0,25	9,25
	0,250	8,6	0	8,38	0	8,17	0,75	8,58
	0,361	8,4	1	8,08	0	7,75	1	8,08
	0,750	7,8	2	7,0	1	7,42	2	7,0
	1	7,5			2	6,25		
	2	7,2						
70 °С	0	9,4	0	8,86	0	9,5	0	9,53
	0,0208	8,8	0,0208	8,63	0,208	8,88	0,0208	9,08
	0,0278	8,58	0,0625	7,08	0,0416	7,63	0,0417	9,17
	0,0417	8,3	0,0833	8,58	0,0625	7,13	0,0625	8,38
	0,0833	8,4	0,125	5,83	0,0833	7,58	0,0833	8,25
	0,1667	8,0	0,1667	6,75	0,125	6,58	0,125	7,92
					0,1667	7,0	0,1667	7,75

По экспериментальным данным исследования кинетики термоинактивации вируса НБ в образцах сухой вакцины без стабилизатора, со стабилизаторами ОМ и ГБ при температурах $20 \pm 2^\circ\text{C}$, $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, $55 \pm 0,5^\circ\text{C}$ и $70 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (по 3 серии вакцины с одним и тем же стабилизатором) вычисляли константы скоростей инактивации вируса при этих температурах для всех исследованных серий сухой вакцины.

В координатах $(\ln K_t)$ и $(1/T)$ строили графики зависимости от температуры полученных констант скоростей инактивации вируса в испытанных защитных средах.

Вычислены коэффициенты регрессии a_0 и a_1 в уравнении $\ln K_{\text{ин}} = a_0 + a_1 \cdot 1/T$ и показана адекватность линейной модели по F-критерию в интервале исследованных температур ($20^\circ\text{--}70^\circ\text{C}$).

Показано, что зависимость константы скорости инактивации вируса НБ от температуры является линейной в координатах $(K_{\text{ин}})$ - $(1/T)$ и выражается следующими уравнениями:

- для вируса, высушенного без стабилизатора, –
 $\ln K_{\text{б/с т}} = 38,48 - 15,58 \cdot 1/T \cdot 10^3$;
- для вируса, высушенного с обезжиренным молоком (ОМ), –
 $\ln K_{\text{ОМ}} = 35,27 - 14,77 \cdot 1/T \cdot 10^3$;
- для вируса, высушенного в защитной среде ГБ, –
 $\ln K_{\text{ГБ}} = 36,46 - 15,46 \cdot 1/T \cdot 10^3$.

Вычислены значения ΔH , ΔS_t и ΔG_t :

- для вируса, высушенного без стабилизатора, –
 $\Delta H_{\text{б/с}} = (30,94 \pm 0,65)$ ккал/моль;
- для вируса, высушенного с ОМ, –
 $\Delta H_{\text{ОМ}} = (29,34 \pm 0,46)$ ккал/моль;
- для вируса, высушенного со средой ГБ, –
 $\Delta H_{\text{ГБ}} = (30,30 \pm 0,61)$ ккал/моль.

ΔS и ΔG являются характеристиками, зависящими от температуры, их значения приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Значения ΔS и ΔG системы ВСМ+ЗС при различных температурах

$t^\circ\text{C}$	Защитная среда					
	б/с		ОМ		ГБ	
	ΔS (кал/моль·град)	ΔG (ккал/моль)	ΔS	ΔG	ΔS	ΔG
20	17,96	25,68	11,59	25,94	12,76	25,56
37	17,84	25,41	11,47	25,78	12,65	26,34
55	17,73	25,12	11,36	25,61	12,54	26,19
70	17,64	24,89	11,27	25,47	12,45	26,03
	$\pm 2,00$	$\pm 2,09$	$\pm 1,46$	$\pm 1,54$	$\pm 1,93$	$\pm 2,02$

Результаты статистической проверки показали, что с вероятностью 95% величины ΔH и ΔG не зависели от наличия и вида стабилизатора, а значения ΔS одинаково уменьшались при введении в систему как ОМ, так и ГБ. Это говорит о том, что введение стабилизатора в состав вакцины изменяет энтропийный фактор, увеличивая упорядоченность системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам оценки сухой вакцины, как сложной физико-химической системы, определено влияние различных стабилизаторов на величину термодинамических кинетических параметров сухой вакцины против НБ.

2 Показано, что введение стабилизатора в состав вакцины изменяет (одинаково для ОМ и ГБ) энтропийный фактор, увеличивая упорядоченность системы при постоянстве значений теплоты активации и изменения свободной энергии (в пределах точности используемого метода их определения).

3 Наличие стабилизатора в составе вакцины обеспечивает повышение сохранности вируса и, соответственно, стабильности вакцины против НБ.

ЛИТЕРАТУРА

1 Смоленский, В.И. Качество и стандартизация биопрепаратов против болезней птиц / В.И. Смоленский, Ю.В. Зуев, Т.В. Руденко [и др.] // *Ветеринария*. – 2011. – № 1. – С. 44–46.

2 Еремец, Н.К. Обеспечение качества иммунологических препаратов для ветеринарии / Н.К. Еремец, А.Я. Самуйленко, Л.А. Неминущая [и др.] // «*Фармацевтические и медицинские биотехнологии*» : мат. Межд. научно-практич. конф. – Москва, 2012 г. – С. – 292–293.

3 Стабильность коревой вакцины. Комитет экспертов ВОЗ по стандартизации биологических препаратов. – Серия технических докладов ВОЗ. 32 доклад, №673. – 1984. – С.35–36.

4 Теоретические и практические основы технологии сублимационного высушивания биопрепаратов / А.А. Нежута, Э.Ф. Токарик, А.Я. Самуйленко, [и др.] – Курск: Изд-во КГСХА, 2002. – 239с.

5 Скотникова, Т.А. Совершенствование технологии производства и способов применения вакцин против ньюкаслской болезни: Автореф. дис. докт. биол. наук. Щелково, 2010 – 48 с.

6 Скотникова, Т.А. Вакцинопрофилактика ньюкаслской болезни / Т.А. Скотникова, Э.Ф. Токарик // *Ветеринария и кормление*. – 2014. – № 6. – С. 16–18.

УДК 619:616.98:578.825.1:615.371

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОПЫТНОГО ОБРАЗЦА ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РЕОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ПТИЦ

И.В. НАСОНОВ, И.С. РАДЮШ, Н.В. КНЫШ, О.А. БУБАШКО

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского»,
г. Минск, РБ*

Поступила в редакцию 07.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Реовирусная инфекция птиц имеет широкое распространение. Со времени первых сообщений о случаях реовирусного теносиновита в США и Англии заболевание было зарегистрировано во многих других странах, включая Канаду, Шотландию, Японию, Австрию, Австралию, Аргентину, Бразилию, Францию, Израиль, Италию, Нидерланды, Польшу, Украину и Россию [1, 2, 4, 5, 7]. В Республике Беларусь реовирусная инфекция не зарегистрирована, однако существует угроза заноса возбудителя на территорию нашей республики.

В комплексе мероприятий по предупреждению и ликвидации вирусных болезней птиц ведущая роль отведена вакцинации. Для специфической профилактики реовирусной инфекции используются живые и инактивированные вакцины. Несмотря на то, что цыплята всех возрастов могут быть инфицированы реовирусом, развитие заболевания более вероятно, когда заражение происходит преимущественно в суточном возрасте. Поэтому программы вакцинации разработаны для защиты цыплят в первые недели после вывода, т.е. в период наибольшей восприимчивости [1, 5, 6, 7].

Инактивированные вакцины применяются для иммунизации ремонтного молодняка или при переводе в родительское стадо перед началом яйцекладки в возрасте 18–20 недель с целью получения цыплят, иммунных против раннего полевого заражения. Вакцины создают клеточно-опосредованный иммунитет [1, 2, 3]. Убитые вакцины индуцируют лучшую выработку антител, когда они применяются после иммунизаций живыми вакцинами. Поэтому для профилактики реовирусной инфекции рекомендуют использование живых аттенуированных вакцин для иммунизации молодых птиц с последующим введением инактивированных препаратов родительскому стаду [1, 3, 4].

Для успешной профилактики реовирусной инфекции у бройлеров рекомендуется проводить 3-кратную вакцинацию птиц родительского стада, применяя живую вакцину и дважды инактивированную. Титр антител 1:400–1:800 в ИФА у птицы в возрасте 110 суток является достаточным для передачи материнского иммунитета потомству [1, 4, 6].

В настоящее время наибольшее распространение получили вакцины на основе штаммов реовируса «S1133», «2177», «1733», «СО-8», «2408», «ВНИВИП». В Европе наиболее распространена схема специфической про-

филактики реовирусного теносиновита, включающая иммунизацию живой вакциной из штамма «S1133» в возрасте 6–8 суток с ревакцинацией в 5–6 недель, а затем применение инаktivированной вакцины при переводе в родительское стадо в возрасте 90–120 суток [1, 5, 7].

В связи с тем, что вакцина против реовирусного теносиновита птиц в Беларуси не выпускается, а заболевание в случае его возникновения нанесёт значительный экономический ущерб хозяйствам, в рамках программы «Инновационные биотехнологии» на 2008–2010 гг. и на период до 2015г, подпрограмма «Сельскохозяйственная биотехнология (животноводство)», в отделе болезней птиц разработана и зарегистрирована живая вакцина против реовирусного теносиновита птиц из штамма «КМИЭВ-V118». Однако живая вакцина против реовирусной инфекции должна применяться в комплексе с инаktivированной, технология изготовления которой в Республике Беларусь не разработана.

В отделе болезней птиц РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского» проделана следующая работа:

- изготовлен экспериментальный образец инаktivированной вакцины для профилактики реовирусной инфекции птиц (5000 доз) и проведены ее лабораторные испытания;
- разработана технологическая инструкция и инструкция по применению инаktivированной вакцины для профилактики реовирусной инфекции птиц.

Для внедрения инаktivированной вакцины для профилактики реовирусной инфекции птиц в птицеводстве необходимо изготовить опытный образец вакцины и испытать его эффективность на цыплятах в условиях вивария и производства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Вирусосодержащую жидкость получали путем заражения культуры клеток Vero реовирусом птиц. Для этого 48-часовую культуру клеток Vero со 100 % монослоем инфицировали вирусом с множественностью заражения 0,1–0,5 ТЦД/кл, выдерживали при температуре плюс 37,5±0,5°C в течение часа для контакта вируса с клеткой. В качестве поддерживающей использовали среды DMEM и DMEM-HEPES в соотношении 1:1 с добавлением 2 % эмбриональной телячьей сыворотки. Зараженную культуру культивировали при температуре плюс 37,5±0,5°C.

Сбор материала проводили спустя 48–72 часов при поражении не менее 80% клеток. Сосуды с вирусом замораживали при температуре минус 20°C. Затем размораживали при температуре плюс 20–25°C. Вирусосодержащий материал стерильно собирали во флаконы емкостью 200 см³ по 100–150 см³ и осветляли низкоскоростным центрифугированием (2000 об/мин 30 мин.).

Для инаktivации реовируса использовали раствор теотропина. Для этого в суспензию вируса (плюс 37°C) добавляли раствор теотропина с конечной концентрацией 0,25%. Инаktivацию реовируса проводили в течение 24 часов при pH 7,4–7,6 и температуре 37,0±0,5°C с периодическим переме-

шиванием суспензии (3 мин через каждые 2 часа). По окончании инактивации проводили удаление теотропина с применением диализа.

Изучение эффективности опытного образца инактивированной вакцины для профилактики реовирусной инфекции птиц изучали путем определения способности вакцины вызывать у привитых бройлеров и несушек выработку специфических антител, которые обнаруживаются ИФА-методом. Предварительно до вакцинации у птицы определяли уровень антител к реовирусу.

Исследования вакцины проводили на 2-х группах цыплят-бройлеров 90-дневного возраста по 10 голов в каждой, не содержащих антител к реовирусу птиц. Цыплят прививали внутримышечно в дозе 0,3 мл. Первой группе цыплят вводили 0,3 см³ физиологического раствора, а второй группе вводили экспериментальный образец вакцины. Первая группа цыплят служила контролем. Отбор крови для исследований проводили на 7, 14, 21 и 28 суток после вакцинации из подкрыльцовой вены. Сыворотку отделяли общепринятым методом. Затем сыворотки прогревали на водяной бане при температуре 56⁰С для удаления термолабильных ингибиторов. Пробы сыворотки исследовали ИФА-методом на наличие антител к реовирусу птиц.

Исследования вакцины также проводили на 2-х группах цыплят-несушек 90-дневного возраста по 10 голов в каждой, не содержащих антител к реовирусу птиц. Цыплят прививали внутримышечно в объеме 0,3 см³. Первой группе цыплят вводили 0,3 см³ физиологического раствора и ISA-70 в соотношении 30 к 70. Первая группа цыплят служила контролем. Отбор крови для исследований проводили на 14, 21 и 28 суток после вакцинации из подкрыльцовой вены. Сыворотку отделяли общепринятым методом. Затем сыворотки прогревали на водяной бане при температуре плюс 56⁰С для удаления термолабильных ингибиторов. Пробы сыворотки исследовали ИФА-методом (IDEXX, Голландия) на наличие антител к реовирусу птиц.

Испытание эффективности опытного образца инактивированной вакцины для профилактики реовирусной инфекции птиц изучали в условиях ОАО «Дзержинский агрокомбинат» путем определения способности вакцины вызывать у привитых бройлеров выработку специфических антител, которые обнаруживаются ИФА-методом. Цель проведения производственных испытаний – получение достоверных данных о безопасности и эффективности вакцины для широкой реализации и для последующей его регистрации в Республике Беларусь. Вакцинацию птицы рекомендуется проводить в возрасте 90–120 суток, но не позднее, чем за 30 суток до начала яйцекладки. Допускается ревакцинация кур родительских стад старше 7 месяцев по показаниям. Схема вакцинации может меняться ветеринарным врачом хозяйства.

Испытания проводили в соответствии с согласованной и утвержденной в установленном порядке программой и временной инструкцией по применению.

Препарат применяли с профилактической целью для реимунизации кур, привитых живыми вакцинами против реовирусной инфекции птиц. Перед применением вакцину выдерживали в течение 2–3 ч при температуре плюс 18–22⁰С. Во время проведения вакцинации флакон с вакциной периодически встряхивали для восстановления однородности эмульсии.

Вакцину вводили птице внутримышечно (бедро или грудная мышца) с соблюдением правил асептики в объеме 0,3 см³.

Опыт проведен на 100 головах ремонтного молодняка родительского стада бройлеров. На предприятии применяется аналогичная вакцина производства Израиль, которая служила контролем.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Вакцина считается антигенноактивной, если титр антител в сыворотке крови у 80% вакцинированных птиц через 21 сутки после иммунизации будет не ниже 1:800 или прирост антител составляет не менее двух разведений по сравнению с исходным. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Титры антител в сыворотке крови цыплят-бройлеров, иммунизированных опытным образцом вакцины

Группы	Титр антител в ИФА по срокам исследований, сутки			
	7	14	21	28
контроль	0	0	0	0
опыт	4172±110	8208*±1201	10611*±1220	11430*±1185

Примечание – *различия достоверны при $p < 0,05$ по сравнению с предыдущим исследованием

Из таблицы 1 видно, что уже на 7 день после вакцинации титр антител в сыворотке крови цыплят достоверно превышает защитный (800), в дальнейшие сроки исследований (14, 21, 28 дней) титр продолжает возрастать, достигая максимума – 11430* ±1185 на 28 день исследований. В то же время в контрольной группе цыплят в сыворотке антитела отсутствуют. При определении уровня антител к реовирусу до вакцинации выявлено не было. То есть испытанный опытный образец вакцины инаktivированной для профилактики реовирусной инфекции птиц в дозе 0,3 мл на одного цыплёнка внутримышечно является антигенноактивным и вызывает выработку антител у цыплят-бройлеров, уровень которых значительно превышает защитный.

Проведенные исследования показывают, что однократная вакцинация позволяет защитить птицу от заражения реовирусной инфекцией, так как по сообщению Тийс ван Дийка (фирма Интервет), титры антител в пределах 3–4 титрогруппы предохраняют птицу от заболевания. Ревакцинация на 60 сутки может быть предложена в племенных хозяйствах для повышения иммунитета несушек с целью формирования более напряженного иммунитета у цыплят в первые дни жизни. Результаты исследований эффективности опытного образца на несушках представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Титры антител в сыворотке крови кур-несушек, иммунизированных опытным образцом вакцины

№ пробы	Титр антител после вакцинации кур-несушек		
	14 дней	21 день	28 дней
1	3981	3467	6918
2	5370	2754	3162
3	2818	6457	5012
4	1047	6310	2570
5	5012	2570	6607
среднее	3645,6±787,11	4311,6±859,33	4853,8±878,57

Примечание – * фон – отсутствие антител

Из таблицы 2 видно, что на 14, 21 и 28 день после вакцинации титр антител в сыворотке крови кур-несушек достоверно возрастает по сравнению с титром антител до иммунизации инактивированной вакциной против реовирусной инфекции птиц.

При проведении производственных испытаний за птицей опытного и контрольного птичников велось клиническое наблюдение, устанавливались причины падежа кур. До начала применения препарата (фон) и по окончании опыта проведено взятие крови (по 15 проб крови из птичника) для определения серологических показателей (титры антител методом ИФА). После завершения опыта определены показатели профилактической и экономической эффективности (сохранность, затраты на медикаменты), влияние на иммунный ответ к вакцинациям. В течение всего периода наблюдения (30 дней) не отмечено осложнений, связанных с вакцинацией птицы в опытной и контрольной группах. Также не отмечено клинических признаков заболевания реовирусным теносиновитом у всех вакцинированных особей. Сохранность в опытном и контрольном птичнике также существенно не отличалась (99,22% и 99,32%, соответственно).

При исследовании сывороток крови в ИФА через 14 и 21 день после иммунизации наборами «IDEXX» (Нидерланды) достоверных отличий в титрах антител опытной и контрольной групп цыплят не выявлено. Результаты исследований представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Титры антител в сыворотке крови цыплят, иммунизированных опытным образцом вакцины

Группы	Титр антител в ИФА по срокам исследований, сутки	
	14	21
контрольная группа	8401±134	10667±124
«КМИЭВ-V118»	8303±123	10715±128

Таким образом, вакцина инактивированная для профилактики реовирусной инфекции птиц из штамма «КМИЭВ-V118» производства РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» и аналогичная вакцина производства Израиль одинаково способны предупреждать реовирусный теносиновит птиц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1 Опытный образец вакцины инактивированной для профилактики реовирусной инфекции птиц в дозе 0,3 мл на одного цыплёнка внутримышечно является антигенноактивным и вызывает выработку антител у цыплят-бройлеров и цыплят-несушек, уровень которых значительно превышает защитный.

2 Вакцина инактивированная для профилактики реовирусной инфекции птиц из штамма «КМИЭВ-V118» производства РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» способна предупреждать реовирусный теносиновит птиц в условиях птицефабрики на уровне мировых аналогов.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 *Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц / Кэллек [и др.]; под общ. ред. Кэллека. – 10-е изд. – Москва: Аквариум Бук, 2003. – 1232 с.*
- 2 *Болезни домашних, певчих и декоративных птиц / В.С. Прудников [и др.]; под общ. ред. В.С. Прудникова. – Минск: Техноперспектива, 2008. – С.152.*
- 3 *Болезни птиц: учеб. пособие / Б.Ф. Бессарабов [и др.]; под ред. Б.Ф. Бессарабова. – Санкт-Петербург, Москва, Краснодар: Лань, 2007. – 448 с.*
- 4 *Болезни опорно-двигательной системы у птиц: информационный обзор / Российская академия сельскохозяйственных наук, Государственное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства»; сост.: Б.Б. Трефилов, В.В. Пругло. – Санкт-Петербург, 2004. – 64 с.*
- 5 *Насонов, И.В. Диагностика и профилактика пневмовирусной и реовирусной инфекций в промышленных стадах птицы (обзор) / И.В. Насонов, Н.И. Костюк // Эпизоотология, иммунология, фармакология и санитария: международный научно-теоретический журнал. – 2008. – № 3. – С.15–21.*
- 6 *Трефилов, Б.Б. Реовирусная инфекция у птиц и меры борьбы с ней / Б.Б. Трефилов [и др.] // Новое в диагностике и профилактике болезней птиц: материалы науч.-практ. конф., 3–4 июня 2008 г. / Российская академия сельскохозяйственных наук, Межрегиональный научно-технический центр «Племптица», Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства; ред.: Э.Д. Джавадов. – Санкт-Петербург, г. Ломоносов, 2008. – С.98–111.*
- 7 *Avian reovirus: its properties and serological classification / H. Kawamura [et al.] // Natl. Inst. Anim. Health Q (Tokyo). – 1965. – Vol. 5. – P.115–124.*

УДК 619:616.98:578.823.2:636.5

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШТАММА РЕОВИРУСА ПТИЦ «КМИЭВ-V118»

И.С.РАДЮШ

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

Поступила в редакцию 30.06.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Реовирус птиц относится к семейству *Reoviridae*, роду *Orthoreovirus*. Реовирусные вирионы имеют икосаэдрическую форму, содержат двуспиральную фрагментированную РНК с молекулярной массой 12–20 МД, которая составляет 14–20% массы вирусной частицы.

Диаметр реовируса в среднем составляет 70–75 нм [1].

Около 86% веса вируса приходится на долю полипептидов. В вирионе 8 основных полипептидов с М. м. 34–155 kDa. Плавающая плотность белков в хлориде цезия составляет 1,36–1,38 г/см³. Липиды отсутствуют [1, 4].

Основными отличительными свойствами штаммов реовируса птиц являются некоторые особенности репликации и физико-химических свойств. Знание определяющих характеристик вируса делает возможным дальнейшее использование его вакцинных штаммов для разработки эффективных вирус-вакцин.

В связи с этим целью работы явилось определение влияния на биологическую активность штамма реовируса птиц «КМИЭВ-V118» воздействия высокой температуры, эфира и хлороформа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Определение чувствительности штамма реовируса «КМИЭВ-V118» к действию хлороформа осуществляли по методике, предложенной Н.А. Feldman и S.S. Wang [5], для этого использовали штамм реовируса «КМИЭВ-V118» с исходной биологической активностью 6,53 lgЭИД₅₀/см³.

Мнения учёных относительно устойчивости реовируса к хлороформу расходятся, большинство исследователей считает, что реовирус слабо чувствителен к хлороформу [1, 3, 4]. Птичий реовирус не содержит в своём составе липидов, однако по данным научной литературы [2] в том случае, если опыт проводится при температуре плюс 37°C, а не при температуре плюс 4°C, инаktivация инфекционности под действием хлороформа может наблюдаться и у вирусов, не имеющих липидной оболочки. В связи с этим нами были проведены параллельные исследования чувствительности реовируса к хлороформу в его конечной концентрации 10% при температуре плюс 4°C и при температуре плюс 37°C. Смесь вирусосодержащей жидкости штамма реовируса «КМИЭВ-V118» и хлороформа, встряхивали в течение 1ч при температуре плюс 4°C и при температуре плюс 37°C, после чего материал оста-

вили при тех же температурных режимах в течение 4ч.

После экспозиции вируса с хлороформом взвеси центрифугировали в течение 30 мин при 2200 g. Верхний интерфазный слой использовали для определения биологической активности реовируса. Для этого титровали не подвергавшийся воздействию хлороформа и обработанный хлороформом при температуре плюс 4°C и при температуре плюс 37°C штамм реовируса «КМИЭВ-V118» в 10-суточных SPF РКЭ, заражая их 10-кратными (10^{-1} – 10^{-8}) разведениями вируса, используя по 8 SPF РКЭ на каждое разведение. Титр реовируса вычисляли по методу Кербера в модификации Ашмарина и выражали в lg ЭИД₅₀/см³ [2]. Опыт проводили в трех повторностях.

Определение чувствительности штамма реовируса «КМИЭВ-V118» к эфиру проводили по методу G.C. Rovozzo и C.N. Burke [2, 6]. При изучении влияния эфира на биологическую активность реовируса использовали штамм реовируса «КМИЭВ-V118» с исходной биологической активностью 6,53 lg ЭИД₅₀/см³. В пробирки с завинчивающимся колпачком помещали вирусосодержащую жидкость штамма реовируса «КМИЭВ-V118» и добавляли к ней эфир *pro parcosi* в конечной концентрации 20%. В контрольную пробирку, содержащую такой же объем вируса, добавляли 20% PBS. Пробирки герметично закрывали. Встряхивали и оставляли при температуре плюс 4°C на 22 ч, периодически встряхивая. Затем эфир удаляли из смеси испарением под вытяжкой. Титровали обработанный эфиром и интактный штамм реовируса «КМИЭВ-V118» на 10-суточных SPF РКЭ в разведениях 10^{-1} – 10^{-8} , используя на каждое разведение по 8 SPF РКЭ. Титр реовируса вычисляли по методу Кербера в модификации Ашмарина и выражали в lg ЭИД₅₀/см³ [2]. Опыт проводили в трех повторностях.

Вирусы характеризуются разной чувствительностью к воздействию температуры. Особенно отчетливо эти различия выявляются в зоне температур от плюс 50°C до плюс 60°C. Определение чувствительности штамма реовируса «КМИЭВ-V118» к действию температуры определяли по методике, предложенной G.C. Rovozzo и C.N. Burke [2, 6]. Для определения чувствительности к действию температуры использовали штамм реовируса «КМИЭВ-V118» с исходной биологической активностью 6,53 lg ЭИД₅₀/см³. Вирусосодержащую жидкость штамма реовируса «КМИЭВ-V118» разливали в пробирки по 1 см³ и помещали в водяную баню при температуре плюс 56°C, погружая в воду до уровня взвеси. Пробы отбирали в интервалах 1, 2, 6, 8, 15, 18, 20 ч. По истечении указанных сроков пробы немедленно охлаждали. Титровали прогретый и интактный реовирус на 10-суточных SPF РКЭ, заражая их 10-кратными (10^{-1} – 10^{-8}) разведениями вируса, используя по 6 SPF РКЭ на каждое разведение. Титр реовируса вычисляли по методу Кербера в модификации Ашмарина и выражали в lg ЭИД₅₀/см³ [2]. Опыт проводили в трех повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты изучения влияния хлороформа при температуре плюс 4°C и при температуре плюс 37°C на биологическую активность штамма реовируса «КМИЭВ-V118» отражены в таблице 1.

Таблица 1 – Определение чувствительности штамма реовируса «КМИЭВ-V118» к действию хлороформа

Реовирус, обработанный хлороформом	Биологическая активность реовируса, lg ЭИД ₅₀ /см ³
при плюс 4°C	4,53±0,08*
при плюс 37°C	2,12±0,08*
контроль	6,53±0,08

Примечание – *при P<0,001 по сравнению с реовирусом, не подвергавшимся воздействию хлороформа

Из таблицы 1 видно, что при обработке штамма реовируса «КМИЭВ-V118» хлороформом при температуре плюс 4°C происходит снижение биологической активности на 2,0±0,04 lg (при P<0,001), а при воздействии на реовирус птиц хлороформа при температуре плюс 37°C наблюдается падение его биологической активности на 4,41±0,17 lg (при P<0,001). По данным научной литературы [2] у вирусов, устойчивых к хлороформу, наблюдается лишь незначительное снижение титра – разница составляет не более 0,996 lg. Обработка хлороформом чувствительных к его действию вирусов приводит к полной (100%) инактивации их инфекционности.

Таким образом, штамм реовируса птиц «КМИЭВ-V118» проявляет слабую чувствительность к хлороформу при экспозиции при температуре плюс 4°C, при температуре плюс 37°C под действием хлороформа происходит значительное снижение биологической активности реовируса, однако полной его инактивации не происходит.

Как показывают данные, представленные в таблице 2, в опытной (реовирус, обработанный эфиром в конечной концентрации 20%) и контрольной (реовирус с PBS в конечной концентрации 20%) пробах достоверного снижения биологической активности вируса не было отмечено.

Таблица 2 – Определение чувствительности штамма реовируса «КМИЭВ-V118» к действию эфира

Реовирус после воздействия	Биологическая активность реовируса, lg ЭИД ₅₀ /см ³
эфира (20%)	6,45±0,14
PBS (20%)	6,53±0,08

Таким образом, устойчивость вируса к эфиру свидетельствует о том, что штамм реовируса «КМИЭВ-V118» не содержит в своем составе липидов.

Результаты испытаний по определению чувствительности реовируса к действию температуры представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Чувствительность штамма реовируса «КМИЭВ-V118» к действию температуры

Время экспозиции вируса при температуре плюс 56°C, ч	Биологическая активность (титр) вируса, lg ЭИД ₅₀ /см ³			
	1 опыт	2 опыт	3 опыт	Среднее
0	6,53	6,37	6,7	6,53±0,10
1	5,87	6,03	6,37	6,09±0,15
2	5,37	5,37	5,03	5,26±0,11**
6	4,87	5,03	5,37	5,09±0,15*
8	4,87	5,37	5,03	5,09±0,15*
15	4,7	4,87	5,03	4,87±0,10**
18	4,87	4,7	4,87	4,81±0,06**
20	3,7	3,87	3,7	3,76±0,06**

Примечание – *при P<0,01 относительно интактного вируса; **при P<0,001 относительно интактного вируса.

Из таблицы 3 следует, что биологическая активность штамма реовируса «КМИЭВ-V118» при прогревании при температуре плюс 56°C в течение первого часа снижалась на 0,44±0,01 lg, в течение следующего часа титр вируса снижался на 0,83±0,02 lg (при P<0,05). В дальнейшем при прогревании реовируса уменьшение его инфекционности происходило очень медленно. При экспозиции реовируса при температуре плюс 56°C в течение 20 ч биологическая активность штамма реовируса «КМИЭВ-V118» снизилась на 2,77±0,04 lg, по сравнению с биологической активностью интактного вируса, при этом полной его инактивации не происходит. Данные научной литературы [2] подтверждают, что падение инфекционного титра вируса более чем на 1 lg/ч указывает на термолабильность изучаемого вируса, однако снижение биологической активности штамма реовируса «КМИЭВ-V118» происходило значительно медленнее, что показывает определённую устойчивость вируса к действию высокой температуры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Штамм реовируса «КМИЭВ-V118» проявляет высокую устойчивость к воздействию физико-химических факторов:

1) при прогревании штамма реовируса «КМИЭВ-V118» при температуре плюс 56°C в течение 20 ч его биологическая активность снижается на 2,77±0,04 lg (при P<0,001) по сравнению с интактным вирусом, что демонстрирует определённую устойчивость реовируса к воздействию высокой температуры;

2) устойчивость к эфиру и слабая чувствительность к хлороформу свидетельствуют об отсутствии липидов в составе вируса.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц: в 3 ч. Ч. 3. / Б. У. Кэлнек [и др.]; под общ. ред. Б. У. Кэлнека; пер. с англ. И. Григорьевой [и др.]. – М.: Аквариум Принт, 2011. – 404 с.
- 2 Лярски, З. Диагностика вирусных болезней животных = *Diagnostyka Wirusologiczna Chorob Zwierzat*: монография / З. Лярски; пер. с пол. Т. Г. Орлова, Я. С. Ляндесберг; ред. и предисл. В. Н. Сюрин. – М.: Колос, 1980. – 400 с.
- 3 Николаева, И. П. Реовирусная инфекция птиц / И. П. Николаева, Н. В. Крон, С. Н. Гаврилов // III Международный ветеринарный конгресс по птицеводству: материалы, 10–13 апр. / Росптицесоюз. – М., 2007. – С. 94–98.
- 4 Реовирусная инфекция кур (теносиновит) / Б. Ф. Бессарабов [и др.] // Болезни птиц: учеб. пособие / Б. Ф. Бессарабов [и др.]. – СПб., 2007. – С. 138–144.
- 5 Feldman, H. A. Sensitivity of various parvoviruses to chloroform / H. A. Feldman, S. S. Wang // *Proc. of the Soc. for Experimental Biology and Medicine*. – 1961. – Vol. 106. – P. 736–740.
- 6 Rovozzo, G. C. *A manual of basic virological techniques* / G. C. Rovozzo, C. N. Burke. – New Jersey; USA: Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, 1973. – 287 p. – (Biological Techniques Series).

УДК 619:616.937.5

ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА БЕЛКА ТИМУСА ОВЕЦ

И.Ю. ЕЗДАКОВА, Е.В. ПОПОВА, С.Н. СТЕПНОВА

ФГБНУ «Всероссийский институт экспериментальной ветеринарии
им. Я.П. Коваленко», г. Москва, РФ

Поступила в редакцию 26.06.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в научных лабораториях получено множество пептидов и полипептидов тимуса различных видов животных [1,2,3]. Это тимозины (фракция 5 тимозина, Т-альфа-1, протимозин альфа, бетатимозины и др.), тимулин, тактивин, тимический гуморальный фактор, тимопоэтин, тимостимулин, тимический фактор X, тимомодулин, тималин, тимоген и др. Все вышеперечисленные препараты представляют низкомолекулярные белки с молекулярной массой от 1 до 17 kDa, полученные, в основном, из тимуса крупного рогатого скота. Известно, что тимус является местом созревания и дифференцировки Т-лимфоцитов животных. Предшественники Т-клеток мигрируют из костного мозга в корковую зону тимуса, где дифференцируются в зрелые Т-лимфоциты, поступающие затем в периферические органы иммунной системы. У млекопитающих тимус состоит из двух долей, которые разделены на дольки, внутри которых тимоциты образуют три зо-

ны: наружную субкапсулярную, среднюю – корковую и внутреннюю – мозговую (медуллярную). Основу структуры тимусных долек составляют эпителиальные клетки трех типов (кортикальные, медуллярные, nurse cells), влияющие на созревание Т-клеток посредством поверхностных и секретируемых молекул. Так, эпителиальные клетки тимуса продуцируют интерлейкин-7, который является основным цитокином для развития, дифференцировки и пролиферации тимоцитов. Интердигитальные дендритные клетки и макрофаги костномозгового происхождения, находящиеся в тимусе, также секретируют цитокины для развивающихся тимоцитов. Кортикальные и медуллярные тимоциты синтезируют и экспрессируют на своей поверхности CD-антигены (CD1 и CD27), которые, в основном, являются белками (М.м. 43–55 kDa), без которых невозможна активация Т-лимфоцитов. Таким образом, в тимусе под действием пептидов и полипептидов, синтезируемых различными клетками тимуса, происходит «обучение» Т-клеток. И, соответственно, основной мишенью действия препаратов тимического происхождения являются Т-клетки. Но поскольку иммунная система «работает» по принципу сообщающихся весов, действие таких препаратов вне зависимости от исходной направленности изменяет функциональную активность всей иммунной системы в целом [4]. Поэтому целью нашей работы было изучение влияния белка тимуса с молекулярной массой 50 kDa на фагоцитарную активность клеток крови овец.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Белок тимуса (BT50) получали гомогенизацией тимуса барана, трехкратным высаливанием сульфатом аммония при различных концентрациях, методом гель-фильтрации. Оценку степени чистоты и определение молекулярной массы проводили методом электрофореза в ПААГ-ДСН.

В эксперименте использовали 10 овец в возрасте одного года. Опытной группе вводили в/м BT50, контрольной – физиологический раствор, двукратно с интервалом 20 суток. Исследования по определению количества клеток крови и их фагоцитарной активности с частицами латекса (1,1 μ) проводили на 3, 7, 14 и 20 сутки первичного и вторичного иммунного ответа по стандартным методикам.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате осаждения гомогенизата тимуса овцы сульфатом аммония была получена преимущественно белковая взвесь, состоящая из высокомолекулярной и низкомолекулярной группы компонентов. Так как целью работы было оценить свойства высокомолекулярных белков тимуса, в процессе элюции были отобраны фракции с концентрацией белка больше 0,6 мг/мл (280 nm), выходящие в первом пике гель-фильтрации на колонке с Sephacryl S-200. Белковый спектр трех фракций первого пика после концентрирования (ПЭГ-40000) в ПААГ-ДСН был представлен одной полосой, соответствующей маркеру массой 50 kDa. Таким образом, после 5 хроматографических циклов был получен белок м.м. 50 kDa (BT50) с концентрацией белка 4,4 мг/мл.

Полученный белок вводили лабораторным животным двукратно. В результате проведенных исследований была дана количественная характе-

ристика иммунокомпетентных клеток крови (ИКК) у овец в процессе первичного и вторичного иммунного ответа. Также изучена динамика фагоцитарной активности ИКК. На графике показаны количественные параметры фагоцитов крови и их функциональная активность при введении белка тимуса м.м.50 kDa.

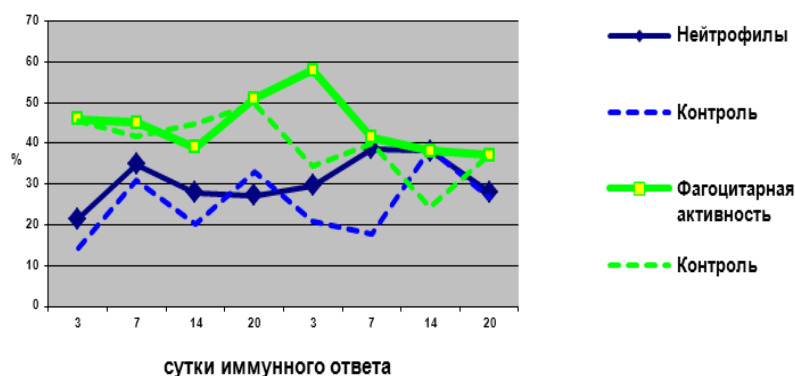


Рисунок – Влияние БТ 50 на показатели клеток крови овец

На графике показано незначительное повышение числа нейтрофилов и их фагоцитарной активности в первичном иммунном ответе. На третьи и седьмые сутки вторичного иммунного ответа достоверно увеличилась функциональная активность и количество фагоцитов. Известна роль низкомолекулярных (10 kDa) препаратов тимусного происхождения в процессе регуляции дифференцировки и пролиферации тимоцитов [3]. В наших предыдущих опытах с препаратом, включавшим в себя тактивин, фагоцитарная активность клеток крови мышей достоверно возрастала на первые и седьмые сутки после введения [5]. В проведенной работе результаты свидетельствуют о том, что белок с большей молекулярной массой активирует фагоциты крови как при первичном, так и при вторичном введении, когда показатели значительно возрастают, что свидетельствует об активации клеток.

Для фагоцитов характерны два основных функциональных состояния: исходное, с низким уровнем проявления физиологических процессов, и активированное, переход в которое обусловлен взаимодействием клеток с различными стимуляторами. Активация фагоцитов сопровождается суще-

ственными морфологическими и биохимическими изменениями клеток. Первая стадия активации, получившая название «прайминг», характеризуется тем, что при незначительной концентрации праймера не вызывает каких-либо функциональных изменений и фагоцит может вернуться в исходное состояние [6]. Однако при увеличении концентрации стимулирующего препарата происходит активация клеток, что нашло подтверждение в наших опытах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методами фракционирования нейтральными солями и колоночной хроматографии был получен белок из тимуса овец с молекулярной массой 50 kDa. Определена иммунохимическая чистота полученного препарата тимуса с концентрацией белка 4,4 мг/мл методом электрофореза в полиакриламидном геле. В результате проведенных исследований установлено, что белок тимуса с м.м. 50 kDa при двукратном введении лабораторным животным стимулирует функциональную активность фагоцитов крови.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о принципиальной возможности использования разработанного метода для получения белков тимуса с иммуностимулирующей активностью.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Low, T.L., Goldstein, A.L. *Thymosin and other thymushormones and their synthetic analogues*// Springer Semin. Immunopathol. –1979. – №2.–P.169–186.
- 2 Goldstein, A.L., Badamchian, M. *Thymosins: chemistry and biological properties in health and disease*//Expert Opin. Biol.Ther. – 2004.– №4(4).–P. 559–573.
- 3 Арион, В.Я. Иммунобиологические свойства и клиническое применение тимозинов и других препаратов тимуса/ В.Я. Арион, И.В. Зиминая, С.Н. Москвина // Иммунопатология, аллергология и инфектология. – 2008. – №1.– С.26–40.
- 4 Хаитов, Р.М., Современные иммуномодуляторы: основные принципы их применения/ Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин // Иммунология.–2000.– №5.– С.4–7.
- 5 Ездакова, И.Ю. Динамика показателей клеточного иммунитета при введении препаратов с иммуностропной активностью / И.Ю. Ездакова, И.В. Третьякова// Материалы Международной учебно-методической и научно-практической конф., посвященной 85-летию МГАВМиБ им. К.И. Скрябина. – М:МГАВМиБ.– 2004.– С.190–194.
- 6 Тутельян, А.В. Прайминг фагоцитов и его применение в системе оценки специфической активности иммунорегуляторных соединений / А.В. Тутельян, Г.И. Клебанов // Иммунология.–2004.–№1.– С.14–16.

УДК 615.017

**АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА АДЬЮВАНТНОГО ПРЕПАРАТА
НА ОСНОВЕ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ПРОДУКТОВ,
ПОЛУЧАЕМЫХ ИЗ ОТХОДОВ ХВОЙНЫХ ПОРОД РАСТЕНИЙ**

Я.Я. ТЫНЬО, Е.И. ЯРЫГИНА, Д.И. ГЕРАСИМОВА, Г.В. МОРОЗОВА

*ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной
медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина», г. Москва, РФ*

Поступила в редакцию 30.06.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка нового поколения вакцин связана с использованием высокоочищенных субъединичных антигенов, способных повысить безопасность вакцин, получить высокоспецифичный иммунный ответ к бактериальным, вирусным патогенам и опухолевым клеткам. Серьезным препятствием при создании субъединичных вакцин является недостаточная иммуногенность изолированных антигенов.

Традиционно для получения гипериммунных моноспецифических поликлональных сывороток используют полный или неполный адьюванты Фрейнда [3], однако из-за высокого уровня реактогенности применение в вакцинологии данных препаратов ограничено [4].

Альтернативой могут стать препараты, обладающие низким уровнем реактогенности. В последнее время в научных статьях все чаще публикуют результаты применения биологически активных препаратов различного происхождения [1, 2].

Постоянное возобновление биомассы в процессе фотосинтеза является одним из главных преимуществ растительного сырья перед не возобновляемыми источниками органического сырья в аспекте их будущего использования. В наше время существует необходимость рационально использовать лесные ресурсы, в том числе и отходы, которые образуются в процессе лесозаготовок и лесопиления. По сути эти отходы могут являться потенциальным сырьем для производства биологически активных препаратов.

Экстрактивные вещества, содержащиеся в зеленой и древесной частях хвойных растений, играют роль регуляторов целого ряда процессов, обеспечивающих жизнедеятельность растений. Богатейший набор тритерпеноидов имеют древесная зелень и кора пихты, среди которых особенно ценные свойства проявили соединения кислотной природы. Поэтому поиск эффективных адьювантов, способствующих повышению иммуногенности вакцин, приобретает большую актуальность [1].

Целью данной работы являлось изучение антигенных свойств нового адьюванта на основе тритерпеновых продуктов, получаемых из отходов хвойных пород растений.

В связи с поставленной целью предстояло решить следующие задачи:

- определить оптимальный способ введения препаратов;

- оценить стимулирующее действие адъювантных препаратов при раздельном и/или сочетанном применении с вакциной против бешенства из штамма «Щелково-51» на лабораторных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для проведения исследования использовались такие препараты, как набор компонентов для диагностики бешенства животных в реакции диффузионной преципитации (РДП) ТУ 9388-006-00497963-99 (ФГБНУ ВНИ-ТИБП), новый адъювант на основе тритерпеновых продуктов, получаемых из отходов хвойных пород растений (регистрационный номер патента 2014115292), адъювант Фрейдна, вакцина против бешенства из штамма «Щелково-51», физиологический раствор.

Состав нового адъюванта:

- 1 терпентинное масло, *Oleum Terebinthinae (Terebinth, rectificatum)* (ГФ VII), ГОСТ 1571-82;
- 2 вода дистиллированная для инъекций (стерильная, апиrogenная);
- 3 физиологический раствор;
- 4 8% раствор сахарозы;
- 5 среда Хенкса.

Для определения антигенных свойств изучаемых веществ были взяты 90 белых аутбредных мышей линии ISR (CD-1) (массой 20 грамм, самцы) в возрасте 4-х недель. Мыши были разделены на 6 групп (по 15 мышей в каждой группе) и провакцинированы следующими препаратами:

- 1-я группа – новый адъювант (в разведении 1:1000);
- 2-я группа – адъювант Фрейнда (в разведении 1:1000);
- 3-я группа – физиологический раствор;
- 4-я группа – новый адъювант + вакцина против бешенства (штамм «Щелково-51»);
- 5-я группа – адъювант Фрейнда + вакцина против бешенства (штамм «Щелково-51»);
- 6-я группа – вакцина против бешенства (штамм «Щелково-51»).

Каждая из 6 групп была разделена на 3 подгруппы (по 5 мышей в каждой подгруппе) для разных способов введения: внутрибрюшинного, внутримышечного, подкожного. Каждая из подгрупп в течение всего исследования занимала отдельную клетку. Корм был предоставлен в соответствии с нормами кормления лабораторных животных. После того, как все группы были провакцинированы, за животными наблюдали в течение 21 суток, затем тотально взяли кровь на сыворотку и изъяли органы.

Критерии, по которым оценивали безвредность и антигенность вводимых различными способами препаратов, служили (1) масса, размер и внешний вид внутренних органов мышей и (2) титр поствакцинальных антител в РДП. При проведении реакции диффузионной преципитации в лунки, расположенные по кругу, вносили сыворотки крови мышей в разведениях 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256; 1:512; 1:1024; 1:2048; 1:4096; 1:8192; 1:16384 до образования выпуклого мениска. В центральную лунку вносили положительный антиген вируса бешенства. Титром антител счита-

ли максимальное разведение сыворотки, дающее положительную реакцию в РДП.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для определения оптимального способа введения использовали 15 мышей, которые были разделены на 3 подгруппы, по 5 особей в каждой подгруппе. Мышам физиологический раствор был введен или подкожно, или внутримышечно, или внутривбрюшинно. Результаты представлены на рисунке 1.

Из данных рисунка 2 следует, что нет статистически достоверной разницы между массами определенных органов при разных способах введения изучаемых препаратов. Однако при внутривбрюшинном способе введения вакцины против бешенства совместно с новым адъювантом у всех особей, кроме одной, наблюдали статистически достоверное ($p > 0,01$) увеличение массы и размеров селезенки.

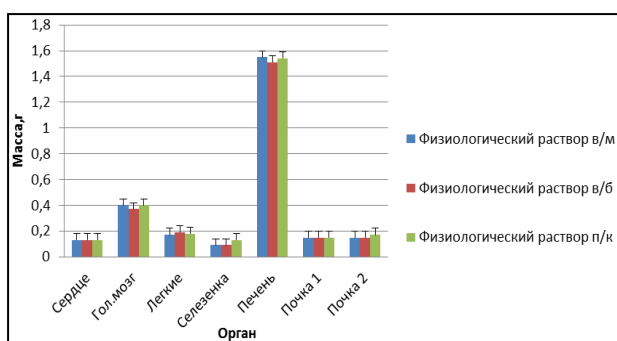


**Рисунок 1 –
Результаты введения
физиологического
раствора мышам
разными способами**

Из данных, представленных на рисунке 1, видно, что способ введения физиологического раствора не оказывает отрицательного влияния на внутренние органы подопытных мышей.

Для оценки стимулирующего действия адъювантных препаратов при раздельном и/или сочетанном применении с вакциной против бешенства из штамма «Щелково-51» на лабораторных животных 90 мышей разделили на 6 групп, которым вводили препараты, как указано в разделе «Материалы и методы».

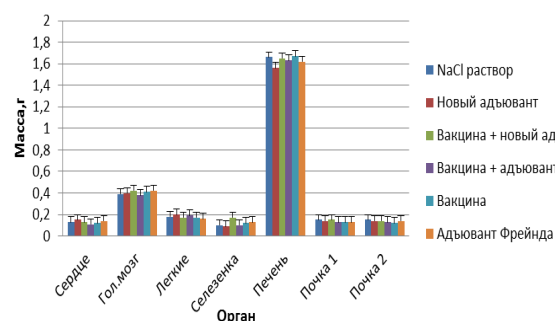


**Рисунок 2 – Масса
внутренних органов
мышей после
внутривбрюшинного
введения
препаратов**

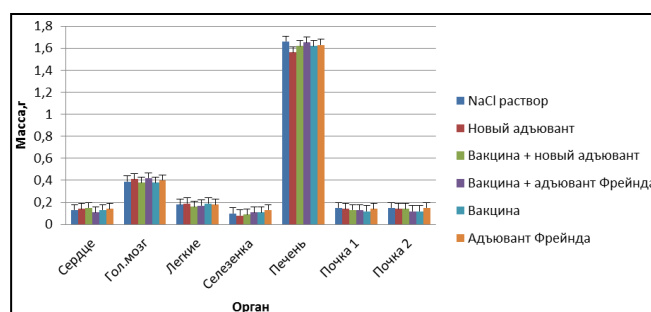


Рисунок 3 – Масса внутренних органов мышей после подкожного введения препаратов

Из данных рисунка 3 следует, что нет статистически достоверной разницы между массами определенных органов. Только у одной особи наблюдали кровоизлияние в перикард, увеличение селезенки и очаговое изменение цвета печени.

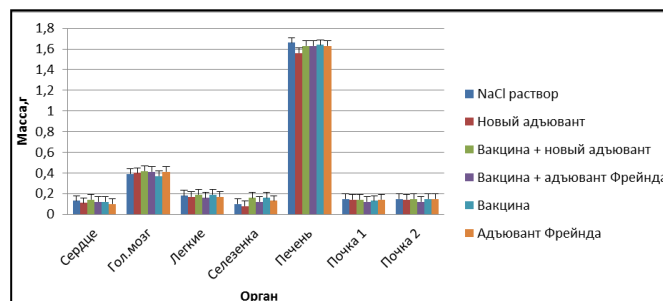


Рисунок 4 – Масса внутренних органов мышей после внутримышечного введения препаратов

Из данных рисунка 4 следует, что нет статистически достоверной разницы между массами определенных органов. У всех особей в группе наблюдалось увеличение селезенки (при введении вакцины и вакцины совместно с новым адъювантом) и изменение цвета печени (при введении вакцины). У одной особи при введении неполного адъюванта Фрейнда наблюдали кровоизлияние в легкие.

Результаты сравнения массы органов мышей при различных способах введения препаратов указывают, что при внутрибрюшинном и внутримышечном способах введения антирабической вакцины совместно с новым адъювантом регистрировали статистически достоверное увеличение массы

и размеров селезенки. Так как селезенка является одним из основных органов иммунной системы, то увеличение иммунокомпетентного органа может свидетельствовать о более эффективной стимуляции клеточного иммунитета при данном способе введения изучаемого препарата по сравнению с другими способами (внутримышечном и подкожном).

Антигенные свойства нового адъюванта оценивали по результатам реакции диффузионной преципитации. Учет результатов РДП проводили через 24 и 48 часов после ее постановки.

Установлено, что:

1 при любом способе введения физиологического раствора (внутримышечно, подкожно, внутрибрюшинно) специфических к вакцинному штамму «Щелково-51» антител в РДП не обнаружено;

2 титр антител в сыворотке мышей, вакцинированных штаммом «Щелково-51» при всех способах введения препарата составил 1:64–1:128;

3 титр антител к вакцинному штамму «Щелково-51», введенному совместно с адъювантом Фрейнда, при всех способах введения препарата оказался в интервале 1:256–1:512;

4 титр антител к вакцинному штамму «Щелково-51» при сочетанном применении с новым адъювантом зависел от способа введения и составил при подкожном, внутримышечно и внутрибрюшинном введении 1:512–1:1024, 1:1024–1:4096 и 1:2048–1:4096 соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проанализировав полученные результаты, мы сделали следующие выводы: наилучшим способом введения является подкожный. Согласно методике РДП используемые группы сывороток крови контрольных животных дали ожидаемый иммунный ответ на введение адъювантных препаратов. Это позволяет утверждать, что исследуемый новый адъювант обладает схожими свойствами с уже лицензированным адъювантным препаратом (адъювант Фрейнда). Это дает возможность считать исследуемый адъювант эффективным, конкурентоспособным препаратом, заслуживающим продолжения клинических и доклинических испытаний, коммерциализации.

ЛИТЕРАТУРА

1 Давидянц, Э.С. Влияние тритерпеновых гликозидов *Silphium perfoliatum* L. на фитопатогенные грибы/ Э.С. Давидянц, [и др.]. // Раст. ресурсы.– 2007. – Т.33, вып. 4. – С. 93–97.

2 Rao, A.V., Gurfinkel, D.M. Dietary saponins and human health / In Saponins in food, feedstuffs and medical plants: Proceeding of the Phytochemical Society of Europe. Eds Oleszek W.; Kluwer Academic Publishers.– 2000.–V.45.–P. 255–270.

3 Schijns, V. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity // Curr. Opin. Immunol. – 2000. – Vol. 12. – P. 456–463.

4 Tong, N.K.C. Immunogenicity and safety of an adjuvanted hepatitis B vaccine in pre-hemodialysis and hemodialysis patients // Kidney Int.–2005.– Vol.6.– P.2298 – 2303.

УДК [615.9:547.26]-074

ПОКАЗАТЕЛИ МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ГЕКСИЛОВОГО ЭФИРА 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ТЕСТАХ *IN VITRO*

Е.К. ВЛАСЕНКО, А.М. ВОЙТОВИЧ, В.А. ГРЫНЧАК,
Н.В. ДУДЧИК, О.А. ЕМЕЛЬЯНОВА

РУП «Научно-практический центр гигиены», г. Минск, РБ

Поступила в редакцию 01.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

В результате разработки защитно-стимулирующих составов для обработки семян агрокультур в Институте биоорганической химии НАН Беларуси создан перспективный регулятор роста растений – гексиловый эфир 5-аминолевулиновой кислоты (ГЭ-АЛК), обладающий выраженными ростостимулирующими свойствами в отношении ряда сельскохозяйственных растений. В соответствии с требованиями межнационального законодательства [1] развернутая схема токсиколого-гигиенических исследований средств защиты растений включает изучение потенциальных мутагенных свойств в батарее тестов.

Цель работы – исследовать мутагенное действие ГЭ-АЛК в тесте Эймса и в цитогенетическом тесте хромосомных aberrаций на культуре лимфоцитов человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Потенциальную мутагенную активность ГЭ-АЛК изучали при помощи тест-систем в соответствии с рекомендациями [2]. Исследования были проведены на бактериальных организмах в тесте Эймса (с метаболической активацией и без) и в тесте хромосомных aberrаций на лимфоцитах человека.

Для оценки мутагенной активности применяли полуколичественный тест Эймса с метаболической активацией [3]. Изучение потенциальной мутагенной активности ГЭ-АЛК проведено с помощью указанной методики с применением 96-луночных микропланшетов в наборе EBPI's Muta-ChromoPlateTM. Для исследования мутагенных свойств в каждом из вариантов тестирования (с метаболической активацией и без) сформировано по три серии опытов с внесением ГЭ-АЛК – в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл, для каждой серии использовали по одному 96-луночному микропланшету. Оценку мутагенного действия ГЭ-АЛК в тесте Эймса на микропланшетах проводили визуально. Наличие фиолетового окрашивания в лунке микропланшета свидетельствовало об отсутствии мутагенного эффекта, в то время как пожелтение лунки означало наличие реверс-мутации тест-культуры.

Приготовление фракции S9 (постмитохондриальный супернатант) осуществляли из печени крыс, получавших фенотербитал в соответствии с методической схемой индукции, предложенной В.В. Ляховичем и И.Б. Цыровым [4].

Культивирование лимфоцитов периферической крови человека для получения метафазных пластинок с целью исследования хромосом осу-

существляли по микрометоду, предложенному Мурхедом с соавторами [5]. Сформировано четыре серии опытов с четырьмя образцами донорской крови: I – контроль (внесение физраствора), и II, III и IV – с внесением ГЭ-АЛК в конечной концентрации 0,05, 0,1 и 0,25 мг/мл соответственно. Флаконы помещали в термостат ТС 80М-2 (Россия) для культивирования при температуре 37⁰С. Препараты метафазных пластинок окрашивали азуром-эозином по Романовскому-Гимза. Метафазы исследовали с помощью микроскопа Axioskop40 (Carl Zeiss, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Примененные для оценки потенциальной мутагенной активности ГЭ-АЛК тест-системы являются краткосрочными, однако при этом отличаются высокой точностью и чувствительностью.

Количество ревертантов в контроле с дистиллированной водой в варианте теста без метаболической активации, а также в варианте теста с полной метаболической активацией находилось в пределах колебаний спонтанного уровня для штамма *S. typhimurium* TA 100. Ответ тест-штамма на стандартный мутаген также зарегистрирован в пределах уровней, характерных для применяемой методики исследований.

В сериях опыта с внесением ГЭ-АЛК в концентрации 100 мкг/мл в вариантах с метаболической активацией и без таковой наблюдали прекращение роста колоний тест-штамма (бактериостатический эффект при полном отсутствии колоний-ревертантов), в связи с чем оценку мутагенной активности при данном уровне воздействия не проводили.

Результаты оценки мутагенной активности действия исследуемого вещества в тесте Эймса без метаболической активации и с полной метаболической активацией на 96-луночных микропланшетах представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты испытания мутагенной активности ГЭ-АЛК в тесте Эймса на микропланшетах

Серия опыта:	Количество лунок в микропланшете, шт.:	Количество лунок с колониями-ревертантами в микропланшете, шт.:			
		контроль, негативный (дист. вода)	ГЭ-АЛК 1 мкг/мл	ГЭ-АЛК 10 мкг/мл	контроль, позитивный (азид натрия)
вариант без метаболической активации	96	43	38	45	90
вариант с метаболической активацией	96	46	51	49	87

Оценку генотоксического эффекта исследуемого вещества проводили путем сравнения количества лунок-ревертантов на микропланшете с анализируемым образцом с приведенным в методике EBPI's Muta-ChromoPlateTM по-

пороговым значением, соответствующим числу лунок-ревертантов в негативном контроле. В случае, если значение количества лунок с ревертантами на микропланшете с анализируемым соединением оказывалось больше либо равно указанному в методике пороговому значению, можно было утверждать, что данное вещество обладает мутагенным действием; в противном случае отмечалось отсутствие ДНК-повреждающего эффекта.

Как видно из представленных результатов, количество лунок ревертантов в исследуемых образцах колебалось в диапазоне от 38 до 51 в обоих вариантах теста. В то же время количество спонтанных мутаций на микропланшетах с негативным контролем в вариантах теста без метаболической активации и с полной метаболической активацией составляло 43 и 46 лунок соответственно. Согласно методике EBPI's Muta-ChromoPlate™ данному количеству лунок соответствовали пороговые значения 55 и 58. Так как ни одна из исследуемых концентраций ГЭ-АЛК в обоих вариантах теста по количеству лунок с ревертантами не превысило данное значение, можно сделать вывод, что анализируемое соединение не индуцировало точковые мутации типа замены пар оснований в геноме бактерий и, следовательно, не обладало генотоксическим потенциалом.

Таким образом, ГЭ-АЛК в концентрации 1 и 10 мкг/мл не вызывал появления колоний-ревертантов выше порогового уровня, следовательно не обладает мутагенной активностью в тесте Эймса с метаболической активацией и без таковой. В то же время применение данного препарата в концентрации 100 мкг/мл прекращает рост колоний и размножение микроорганизмов тест-штамма *S. typhimurium TA 100*.

Цитогенетические препараты, полученные в результате 72-часового культивирования лимфоцитов крови человека, имели достаточное для анализа количество метафазных пластинок с хорошей спирализацией и разбросом хромосом, удобным для исследования каждой хромосомы. В каждом опыте обрабатывали до 100 метафазных пластинок, а при меньшем их количестве принимали во внимание все имеющиеся метафазы. Таким образом, диапазон изученных концентраций ГЭ-АЛК включал дозы, обладающие заметной цитотоксичностью или снижением количества клеток в митозе.

В результате обработки контрольной серии установлен один случай хромосомного повреждения (одиночный фрагмент) при учете 100 метафаз в образце 2 (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты изучения aberrаций хромосом в клетках лимфоцитов человека при воздействии ГЭ-АЛК в течение 72 часов

№ образца	Количество хромосомных aberrаций / количество метафаз			
	Контроль (физраствор)	ГЭ-АЛК 0,05 мг/мл	ГЭ-АЛК 0,1 мг/мл	ГЭ-АЛК 0,25 мг/мл
1	0/100	0/100	0/100	0/100
2	1/100	0/100	0/100	0/80
3	0/100	0/100	0/100	0/75
4	0/100	0/100	0/100	0/29

Как следует из таблицы 2, ГЭ-АЛК в дозах 0,05, 0,1 и 0,25 мг/мл не выз-

вал увеличения числа аберрантных клеток в опытных сериях по сравнению с контрольной. При этом зарегистрировано заметное снижение количества клеток с метафазами в серии IV при воздействии ГЭ-АЛК в дозе 0,25 мг/кг. Обнаруженный эффект может быть связан как с токсическим действием изучаемого соединения на культивируемые *in vitro* лимфоциты, так и с проявлением антипролиферативных свойств ГЭ-АЛК. Последняя гипотеза не находит подтверждения при анализе лейкограммы периферической крови крыс, получавших ГЭ-АЛК в субхроническом эксперименте. Так, у животных, подвергавшихся воздействию токсических доз препарата (ежедневное введение дозы, кратной 1/10 от DL_{50ac}), даже при наличии летальных исходов в группе не обнаружено заметных отклонений в лейкоцитарной формуле.

Проведенные эксперименты позволяют сделать вывод об отсутствии мутагенной активности ГЭ-АЛК в тесте хромосомных абберраций на лимфоцитах человека. При этом данное соединение может оказывать цитотоксическое действие на культивируемые клетки лимфоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате изучения показателей мутагенного действия установлено, что ГЭ-АЛК не способен индуцировать точковые мутации в тесте Эймса и не вызывает увеличения количества хромосомных абберраций в цитогенетическом тесте на лимфоцитах человека. Максимально испытанные концентрации препарата обладают бактериостатическим эффектом в отношении тест-штамма *S. typhimurium TA 100* и цитотоксическим действием на клетки лимфоцитов человека. Таким образом, в условиях проведенного эксперимента ГЭ-АЛК не обладает мутагенной активностью.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) : утв. Решением Комиссии таможенного союза от 28 мая 2010 года, № 299. – Глава II, разд. 15: Требования к пестицидам и агрохимикатам.
- 2 Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ / подгот. Междунар. комиссией по защите от мутагенов и канцерогенов окруж. среды; пер. с англ. – М. : Медицина, 1989. – 212 с. – (Гигиен. критерии состояния окруж. среды 51 / ВОЗ).
- 3 Ames, B.N. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test* / B.N. Ames, J. McCann, E. Yamasaki // *Mutat. Res.* – 1975. – 31. – 347–364.
- 4 Ляхович, В.В. Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков / В.В. Ляхович, В.В. Цырлов. – Новосибирск : Наука, 1981. – 240 с.
- 5 *Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood* / PS Moorhead [et al.] // *Exp Cell Res.* – 1960. – Sep. 20. – P. 613–6.
- 6 Kotelevtsev, S. V. Glaser *Biomonitoring of Genotoxicity in Coastal Water. In book Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries* / S. V. Kotelevtsev, L. I., Stepanova, V. M. Glaser, ed. K.J.M. Kramer // CRC Press Inc. – 1993. – Vol. 127. – № 11. – P. 227–245.
- 7 Стволинский, С.Л. Эколого-токсикологический анализ на основе биологических мембран / С.Л. Стволинский, А.М. Бейм. – М.: Изд-во МГУ, 1986. – С. 106.

УДК619:615.37.012

**ЛАБОРАТОРНЫЙ РАБОЧИЙ ЭТАЛОННЫЙ МАТЕРИАЛ
В ОБЕСПЕЧЕНИИ И КОНТРОЛЕ КАЧЕСТВА НАБОРА
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ХЛАМИДИОЗА
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ**

Л.С. ЛЮЛЬКОВА, Н.К. ЕРЕМЕЦ, Л.А. НЕМИНУЩАЯ

*ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический
институт биологической промышленности», г. Щелково, РФ*

Поступила в редакцию 10.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Широкое распространение в нашей стране и за рубежом имеют инфекционные заболевания, вызываемые облигатными внутриклеточными микроорганизмами семейства *Chlamydiaceae* рода *Chlamydia*. Успешная организация борьбы с этими заболеваниями возможна лишь при условии их своевременного и полного выявления, а это, учитывая многообразие клинических форм, представляет значительные трудности.

В настоящее время диагностику хламидиоза животных осуществляют в соответствии с «Методическими указаниями по лабораторной диагностике хламидийных инфекций у животных», утвержденными Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода России 30 июня 1999 г. №13-7-2/643. Согласно этим указаниям, диагностика включает выявление специфических антител в сыворотке крови больных животных и птиц серологическими методами. Стандартным серологическим тестом определения хламидийных антител, рекомендуемых МЭБ, также является реакция связывания комплемента (РСК).

На базе ФГБНУ ВНИТИБП в 1994 г. организовано опытное производство наборов для диагностики хламидиоза сельскохозяйственных животных в РСК и РДСК. Имеется пакет разрешительных документов (Лицензия Правительства Московской области №00-08-1-000044; Аттестат рег. №1236; Санитарно-эпидемиологическое заключение № 50.19.06. 000.М. 000171.05.09; Декларация о соответствии №000326). Наборы сертифицированы в Системе сертификации ГОСТ Р [5].

В деятельности опытного производства реализованы основные принципы обеспечения качества лекарственных средств для животных, требуемые стандартами МС ИСО 9001-2011, ИСО серии 1400 и правилами GMP [1, 2, 3].

Национальными стандартами ГОСТ Р 52249-2009 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств», ГОСТ Р 52537-2006 «Производство лекарственных средств. Система обеспечения качества. Общие требования» и «Правилами организации производства и контроля качества лекарственных средств» (Приказ Министерства промышленности и торговли РФ № 916 от 14 июня 2013 г.) предусмотрено, что производство

лекарственных средств, в том числе диагностических препаратов, должно гарантировать качество выпускаемого биопрепарата, т.е. его активность, специфичность, стабильность [1, 3].

Согласно требованиям Надлежащей лабораторной практики (GLP) [4], для обеспечения качества выпускаемой продукции при тестировании любого материала (объекта) необходимо использовать эталонный образец (образец для сравнения), который предварительно должен быть охарактеризован для получения статуса эталонного. Лабораторный рабочий эталонный материал (ЛРЭМ) применяют для определения биологической активности при серийном производстве препаратов, испытании нового биологического препарата, сравнении результатов научных исследований и др.

Совершенствование технологии производства и методов обеспечения качества диагностических препаратов, включая использование ЛРЭМ, является надежным способом повышения конкурентноспособности иммунобиологических препаратов [6].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

«Набор для диагностики хламидиоза сельскохозяйственных животных в РСК и РДСК», изготавливаемый на опытном производстве ФГБНУ ВНИТИБП, состоит из четырех компонентов:

- антиген хламидийный – 10 ампул;
- антиген контрольный – 2 ампулы;
- сыворотка хламидийная – 5 ампул;
- сыворотка контрольная – 3 ампулы.

Основным документом на производство наборов является «Опытно-промышленный технологический регламент на производство и контроль наборов для диагностики хламидиоза сельскохозяйственных животных в РСК и РДСК», утвержденный в надлежащем порядке, предусмотренном ГОСТ Р 54763–2011. «Средства лекарственные для ветеринарии. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ РЕГЛАМЕНТЫ ПРОИЗВОДСТВА. Содержание, порядок разработки, согласования и утверждения».

Для изготовления специфического хламидийного антигена использовали хламидии штамма «Улетово-96-ВНИТИБП», депонированного в коллекции микроорганизмов ВГНКИ 03.02.2000 г.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При организации опытного производства учтены основные требования национальных стандартов ГОСТ Р 9001-2008, ГОСТ Р 52249-2009, ГОСТ Р 52537-2006 и Принципов ХАССП, обеспечивающие качество иммунобиологического препарата (активность, специфичность, стабильность) и безопасность его производства. Производственные помещения оснащены оборудованием, необходимым для экологически безопасного изготовления и контроля ветеринарных препаратов.

В соответствии с рекомендациями ВОЗ и требованиями GLP для контроля качества и стандартизации компонентов набора (по активности, специфичности, стабильности) с целью исключения ошибок на всех этапах производства использовали лабораторные рабочие эталонные образцы (ЛРЭМ) [4].

Для оценки стабильности технологического процесса, согласно рекомендациям ВОЗ, в работе применяли условные эталонные серии хламидий штамма «Улетово-96-ВНИИТИБП». Титр инфекционной активности хламидий определяли по результатам пяти титрований в пяти повторностях на разных партиях развивающихся эмбрионов кур.

Установлено, что для посевных материалов хламидий штамма «Улетово-96-ВНИИТИБП» инфекционная активность (титр) должна быть в диапазоне от $5,5 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ до $9,5 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$.

Для эталонной серии хламидий штамма «Улетово-96-ВНИИТИБП» построена гистограмма и определены среднее значение титра инфекционной активности хламидий (X) и его среднеквадратичное отклонение (S), которые составили $X=6,5 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ и $S=\pm 0,5 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$.

Полученный график очень близок к гистограмме с двусторонней симметрией, что свидетельствует о близости распределения значений инфекционной активности хламидий эталонной серии к нормальному и, следовательно, результатов определения инфекционной активности хламидий главного (Master seed, M.s.), рабочего (Working seed, W.S.), производственного (Production Seed, P.S.) посевных материалов, используемых при изготовлении хламидийного антигена.

Таким образом, если полученное в ходе определения значение инфекционной активности хламидий эталонной серии укладывается в интервал $(6,5 \pm 0,5) \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$, то условия определения можно считать стандартными, а полученное значение инфекционной активности в контролируемой серии хламидий – достоверными при величине ошибки определения, равной $\pm 0,5 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$.

Образцы препаратов эталонных серий хранили при температуре минус $(70 \pm 1) ^\circ\text{C}$ и использовали при определении титра инфекционной активности хламидий главного (Master seed, M.s.), рабочего (Working seed, W.S.), производственного (Production Seed, P.S.) посевных материалов.

На основании результатов исследований был разработан и утвержден в установленном порядке СТО 70952707-0048-2012 (Производственный штамм хламидий «Улетово-96-ВНИИТИБП». Изготовление и контроль посевных материалов).

Основным показателем качества набора является активность (титр) и специфичность его компонентов. Для стандартизации условий производства хламидийного антигена и хламидийной сыворотки в качестве лабораторных эталонных использовали по 3 серии лиофилизированных препаратов. Активность и специфичность лабораторных рабочих эталонных образцов определяли по результатам пяти исследований в РСК и ИФА в пяти повторностях.

Установлено, что лабораторные рабочие эталонные образцы хламидийного антигена и хламидийной сыворотки сохраняют активность (титр в РСК и ИФА), специфичность, физико-химические свойства в течение не менее 3-х лет (срок наблюдения) при температуре хранения $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

Лабораторные рабочие эталонные образцы (ЛРЭМ) использовали для контроля по показателям качества каждой выпускаемой на опытном производстве серия наборов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что изготовление и использование лабораторных эталонных серий в производственной практике способствует снижению вероятности получения ошибочных данных при массовых определениях активности биологических препаратов.

Внедренные элементы совершенствования технологического процесса производства позволяют изготавливать наборы высокого качества и эффективности.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 ГОСТ Р 52537-2006 «Производство лекарственных средств. Система обеспечения качества. Общие требования». – введ. М.:Стандартинформ, 2007.
- 2 ГОСТ Р ИСО 9001-2008 «Системы менеджмента качества. Требования». – Введ. – М. Стандартинформ, 2008. – С. 50–54.
- 3 ГОСТ Р 52249-2009 «Правила производства и контроля лекарственных средств». – Введ. – М.:Стандартинформ, 2009. – С.50–51.
- 4 ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики». – Введ. – М.: Стандартинформ, 2010.
- 5 Люлькова, Л.С. Опытное производство наборов для диагностики хламидиоза сельскохозяйственных животных в РСК (РДСК) / Л.С. Люлькова, В.И. Еремец, А.Я. Самуйленко // Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных препаратов. Шелково. – 2003. – С.118–120.
- 6 Панин, А.Н. Состояние и проблемы обеспечения качества лекарственных средств для животных/ А.Н. Панин, Л.В. Кириллов, А.Ф. Гарбузов, В.И. Смоленский [и др.] // Сб. научных трудов ВГНКИ. – 2007. – Т.68. – С.3–9.

Раздел 4. ФАРМАКОЛОГИЯ

УДК [615.9:547.26]-074

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕКСИЛОВОГО ЭФИРА 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПУТЯХ ОДНОКРАТНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

Е.К. ВЛАСЕНКО, В.А. СТЕЛЬМАХ, И.И. ИЛЬЮКОВА, В.А. ГРЫНЧАК

РУП «Научно-практический центр гигиены», г. Минск, РБ

Поступила в редакцию 01.07. 2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Гексиловый эфир 5-аминолевулиновой кислоты (ГЭ-АЛК) признан перспективным отечественным регулятором роста сельскохозяйственных растений. В целях обоснования и проведения мероприятий, направленных на защиту здоровья человека и среды его обитания еще на стадии проектирования производства, а также в соответствии с требованиями международного законодательства [1] необходимо выявить закономерности проявления токсических свойств ГЭ-АЛК при различных путях однократного введения в организм лабораторных животных. Указанные данные, вкуче с материалами токсикологического изучения ГЭ-АЛК при других режимах воздействия служат исходными для обоснования ряда гигиенических регламентов безопасного производства и применения в сельском хозяйстве.

Цель работы – установить в развернутых токсикологических экспериментах верхние параметры токсичности ГЭ-АЛК в условиях однократного интрагастрального воздействия, а также в опытах на животных дать оценку раздражающим, местно-раздражающим и сенсибилизирующим свойствам данного соединения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эксперименты выполнены на нелинейных белых мышах массой тела 17–23 г, рандомбредных белых крысах, массой тела 180–210 г и на кроликах породы Шиншилла массой 4,2–4,5 кг. Обращение с животными соответствовало этическим принципам надлежащей лабораторной практики [2]. Водные растворы ГЭ-АЛК получали *ex tempore*; к контрольным группам животных применяли аналогичную схему эксперимента с эквивалентными объемами растворителя (дистиллированной воды).

Острое отравление моделировали однократным введением ГЭ-АЛК в желудок подопытных животных с помощью иглы-зонда, последующее наблюдение продолжалось в течение 14 суток с регистрацией симптомов клинической картины отравления. В данных экспериментах использовано 12 групп белых мышей (самцов и самок), которым вводили ГЭ-АЛК в дозах 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 и 5000 мг/кг, а также 10 групп белых крыс (самцов и самок), получавших изучаемое соединение в дозах 2500, 5000, 7500, 8000, 10000, 12000 и 12500 мг/кг. Каждая экспериментальная

группа состояла из 5–6 лабораторных животных. Количественные параметры острой токсичности рассчитывали пробит-анализом в изложении М.Л. Беленького с уточнением характеристик потенциальной опасности смертельного отравления [3].

Определение степени опасности отравления при трансдермальном пути поступления проведено на 7 беспородных белых крысах-самцах, наблюдение за состоянием крыс проводили в течение 14 суток с регистрацией развития симптомов интоксикации [4].

Токсичность ГЭ-АЛК (50% водного раствора) при ингаляционном воздействии аэрозоля дезинтеграции изучали на белых мышах обоего пола (10 самцов и 10 самок) в затравочной камере объемом 250 дм³. Длительность ингаляционной затравки составляла 2 часа, после чего за состоянием подопытных животных наблюдали еще в течение 14 суток [6].

Изучение местно-раздражающих свойств проведено на 7 белых беспородных крысах-самцах, степень выраженности эритемы, величину отека кожи и его интенсивность оценивали согласно «Требованиям к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ» [4].

Исследование особенностей раздражающего действия ГЭ-АЛК на слизистые оболочки глаз выполнены на кроликах-самцах. ГЭ-АЛК в количестве 50 мкл 50%-го водного раствора вносили в нижний конъюнктивальный свод правого глаза кролика, левый глаз (50 мкл дистиллированной воды) служил контролем. Регистрировали проявление признаков раздражения слизистых оболочек глаз – гиперемии конъюнктивы и роговицы, отека век, выделений из глаза [4].

Оценку сенсibiliзирующих свойств выполняли с помощью модели воспроизведения гиперчувствительности замедленного типа [4]. Эксперимент проведен на белых беспородных мышах-самцах (по 10 особей в опытной и контрольной группах), ГЭ-АЛК растворяли в физиологическом растворе.

Результаты исследований обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики. Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез был принят $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При однократном внутрижелудочном введении ГЭ-АЛК самцам и самкам белых мышей в диапазоне испытанных доз от 2000 до 5000 мг/кг наблюдали признаки интоксикации в виде скованности, тремора передних и задних конечностей, нарушения координации движения («ходульная» походка), учащенного дыхания, судорог, паралича задних конечностей. Гибель наступала через 5–15 мин после введения исследуемого соединения.

При однократном внутрижелудочном введении ГЭ-АЛК самцам и самкам белых крыс в диапазоне испытанных доз от 2000 до 12500 мг/кг регистрировали следующие симптомы интоксикации: нарушение ориентировочно-координационной активности, боковое положение тела, апноэ. Гибель крыс происходила спустя 10–30 мин после введения препарата. Параметры токсикометрии и характеристики опасности потенциального отравле-

ния при однократном внутрижелудочном воздействии ГЭ-АЛК представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Параметры токсичности и потенциальной опасности острого отравления ГЭ-АЛК при однократном внутрижелудочном введении

Вид животных	Величины летальных доз, мг/кг			Показатели потенциальной опасности острого отравления	
	DL ₁₆	DL ₅₀	DL ₈₄	S	R
мыши, самцы	2540	3000 (2630÷3420)	3540	1,18 (0,99÷1,4)	1,39
мыши, самки	2470	3170 (2710÷3710)	3900	1,26 (1,13÷1,41)	1,58
крысы, самцы	6350	8800 (6560÷11800)	12500	1,41 (0,97÷2,0)	1,97
крысы, самки	4800	7800 (5740÷10600)	12600	1,62 (1,12÷2,35)	2,63

Во время изучения токсических свойств ГЭ-АЛК в условиях эпикутанного воздействия в период наблюдения после однократных аппликаций не зарегистрировано проявлений интоксикации и гибели животных. В пересчете на массу тела подопытных животных экспозиционная доза ГЭ-АЛК составила 800 мг/кг, что является максимально возможной величиной для условий данного эксперимента. Следовательно, средняя смертельная доза при однократном нанесении на кожу животных превышает значения, принятые в качестве классификационных при отнесении веществ к 3 классу – веществам умеренно опасным.

В условиях проведения ингаляционной затравки (максимально достижимая концентрация мелкодисперстного аэрозоля дезинтеграции препарата составила 72,2 мг/м³) и в последующие 14 суток наблюдения после воздействия ГЭ-АЛК гибель животных и признаки интоксикации отсутствовали. Мыши были подвижны, у них сохранялся нормальный уровень спонтанной двигательной активности. К окончанию эксперимента прирост массы тела животных, подвергнутых однократному ингаляционному воздействию ГЭ-АЛК, не имел достоверных отличий по сравнению с контролем.

В процессе изучения местно-раздражающего действия ГЭ-АЛК не выявлены признаки гиперемии и визуально значимые изменения статуса кожных покровов подопытных животных. При эпикутанном воздействии ГЭ-АЛК визуально на коже опытных и контрольных животных в течение всего периода наблюдения эритематозных проявлений не зарегистрировано (0 баллов при оценке степени выраженности эритемы), не зафиксировано также нарастания инструментально измеряемой толщины кожной складки

животных по сравнению с фоном (градация интенсивности – отсутствие реакции, оценка отека в баллах – 0 баллов). Поверхность кожи в местах аппликаций была аналогична таковой у контроля, кожный покров не имел уплотнений, шелушений и инородных образований. Таким образом, суммарная количественная оценка степени индукции эритемы и отека для контроля и опыта при воздействии ГЭ-АЛК составляет по 0 баллов. Следовательно, в условиях, принятых для оценки кожно-раздражающего действия при тестировании на лабораторных животных [4], ГЭ-АЛК не способен к индукции выраженных местно-раздражающих свойств.

Инстилляция ГЭ-АЛК в нижний конъюнктивальный свод правого глаза в течение 1 часа у кроликов приводит к обильному слезотечению, умеренному покраснению сосудов конъюнктивы и отеку век. В результате чего наблюдались проявления блефароспазма (глаз закрыт полностью). Симптомы повреждения слизистых оболочек глаза сохранялись в течение последующих 9 дней наблюдения. Результаты изучения представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Количественная оценка раздражительного действия ГЭ-АЛК на слизистые оболочки глаз кроликов

Симптомы повреждения	Характеристика выраженности симптомов	Оценка, баллы
гиперемия конъюнктивы	сосуды инъецированы на протяжении 9 суток наблюдения	1
отек век	блефароспазм в течение 24 часов после воздействия, проявления отека век исчезают на 5-е сутки наблюдения	4
выделения из глаза	количество выделений увлажняет веки и окружающие ткани в 1-е сутки после воздействия, выделения из глаза регистрируются на протяжении 5 суток наблюдения	3

Итоговая классификационная оценка повреждающего действия ГЭ-АЛК по суммации баллов интенсивности каждого из симптомов раздражающего действия на слизистые оболочки глаз (в сумме 8 баллов) позволяет отнести, согласно «Требованиям к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ» [4], данное соединение к 3 классу – химическим соединениям, обладающими выраженными раздражительными свойствами. Вызываемый однократной инстилляцией ГЭ-АЛК местный воспалительный процесс патологически характеризуется как серозный блефароконъюнктивит.

Выявление аллергизирующих свойств ГЭ-АЛК проводили на седьмые сутки опыта после экспериментальной сенсибилизации в тесте опухания лапы на белых мышах (ТОЛМ). Результаты исследований установлено, что препарат не вызывает развитие у белых мышей гиперчувствительность замедленного типа (таблица 3). Так, абсолютная величина отека лапы

у опытных животных статистически значимо не отличалась от контрольных значений. В связи с тем, что среднегрупповой показатель отека у опытных и контрольных животных в абсолютных единицах не превышал 0,1 мм (0 баллов в опыте и контроле), количественную оценку теста опухания лапы мышцей в относительных единицах (ТОЛМ, в баллах) не проводили.

Таблица 3 – Величина отека лапы при исследовании сенсibilизирующего действия ГЭ-АЛК в тесте опухания лапы у мышей, М(±95%ДИ)

Показатели индукции гиперчувствительности замедленного типа	Группы сравнения	
	контроль	опыт
величина толщины лапы мышцей до введения разрешающей дозы, мм	1,31 (1,26–1,36)	1,36 (1,32–1,39)
величина толщины лапы мышцей через 24 часа после введения разрешающей дозы, мм	1,33 (1,27–1,38)	1,39 (1,35–1,42)
среднегрупповой показатель ТОЛМ в абсолютных единицах, 10 ⁻² мм	1,6 (0,7–2,5)	2,8 (1,7–3,9)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных на трех видах лабораторных животных исследований токсических свойств ГЭ-АЛК при различных режимах и путях однократного воздействия установлено, что препарат, согласно ГОСТ 12.1.007-76, относится к III классу опасности (умеренно опасное химическое соединение). При использовании принятых схем проведения экспериментов трансдермальная и ингаляционная токсичность ГЭ-АЛК, а также его сенсibilизирующие и кожно-раздражающие свойства не зарегистрированы. ГЭ-АЛК относится к химическим соединениям, обладающим выраженным ирритативным действием (3 класс), вызывая у кроликов при однократной инстилляции серозный блефароконъюнктивит.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю), утв. Решением Комиссии таможенного союза от 28 мая 2010 года, № 299. Глава II, разд. 15: Требования к пестицидам и агрохимикатам.
- 2 Надлежащая лабораторная практика: ТКП 125–2008 : утв. Постановлением М-ва здравоохранения Респ. Беларусь 28.03.2008, № 56. – Введ.01.05.2008. – Минск, 2008. – 35 с.
- 3 Беленький, М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта / М.Л. Беленький. – Рига: Изд-во Акад. наук Латв. ССР, 1959. – 115 с.
- 4 Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ: инструкция: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 14.12.04. – Минск, 2004. – 43 с.

УДК 619:615.27:616.391:636.22./28

ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОВОГО ВЕТЕРИНАРНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ НАНОСЕЛЕНА

М.П. КУЧИНСКИЙ, А.Н. БЕЗБОРОДКИН

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского»,
г. Минск, РБ*

Поступила в редакцию 07.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Селен является жизненно необходимым микроэлементом для организма человека и животных. Он входит в состав ряда специфических белков, которые регулируют проницаемость клеточных мембран и предохраняют их от перекисного окисления, обеспечивают подвижность, жизнеспособность половых и повышают активность иммунокомпетентных клеток, а также способствует нормальному функционированию щитовидной железы. [2, 10]. Кроме того, селен положительно влияет на усвоение и расход витаминов Е, А, С и К, стимулирует синтез убихинона, серосодержащих аминокислот, принимает участие в детоксикации тяжелых металлов, хлорорганических соединений [3]. Ветеринарные препараты на основе соединений селена давно применяются в практике животноводства, причем чаще в виде селенитов, в которых данный элемент находится в степени окисления +4. Более широкое использование селенитов в ветеринарии сдерживается низкой стабильностью их растворов и высокой токсичностью. Предполагают, что последнее связано с окислительными свойствами указанных соединений, из-за которых происходит превращение тиолсодержащих белков в протеины, содержащие группу S-Se-S. В дальнейшем эти соединения могут приводить к образованию ядовитого диметилселена и изменению третичной структуры белков с нарушением их биологической функции [4].

С учетом этого, в последние годы большое внимание уделяется разработке новых средств профилактики беломышечной болезни и других гипомикроэлементозов животных без включения в их состав минералов в виде солей. Как показывают клинические исследования, перспективными могут быть препараты нового поколения, созданные на основе микроэлементов в виде наночастиц железа, кобальта, меди, марганца [6, 8, 9]. Основное преимущество наноразмерных частиц элементов в том, что они имеют более низкую токсичность, более высокую биологическую активность, лучше накапливаются в органах и тканях [1, 5]. Началом изучения нового препарата является изучение его токсикологических свойств. Токсикологическая оценка – обязательное условие для регламентации в ветеринарии. Результаты этой оценки служат основанием для выработки критериев дальнейших исследований и схем применения препарата на практике [7]. В данной статье приводятся результаты изучения некоторых токсикологических характеристик созданного нами нового ветеринарного препарата на основе наноразмерных частиц селена, получившего название «Наноселен».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования по определению параметров токсичности и безвредности препарата проводили согласно методическим указаниям [7]. Опыт по изучению острой токсичности был организован на белых мышах обоего пола живой массой тела 18–22 г. В начале эксперимента каждое лабораторное животное взвешивали и рассчитывали необходимую дозу препарата. После её введения за мышами осуществляли ежедневное клиническое наблюдение в течение 16 дней. При этом регистрировали их поведение, внешний вид, аппетит, жажду, реакцию на внешние раздражители, наличие судорог, парезов, параличей конечностей, цвет кожи и слизистых оболочек, развитие наркотического или коматозного состояния, других симптомов интоксикации, а также регистрировали гибель. Павших и выживших животных подвергали патологоанатомическому исследованию. В течение опыта условия кормления и содержания опытных и контрольных животных были идентичными. Испытуемый препарат вводили мышам внутривентрально натошак один раз в сутки с помощью шприца, снабженного иглой-зондом. Испытано 7 доз препарата: 7500, 10000, 12500, 15000, 17500, 20000, 22500 мг/кг живой массы.

Контрольной группе животных вводился изотонический раствор натрия хлорида в объёме 1 мл. Каждая выбранная доза испытывалась на 10 мышах. При клиническом наблюдении учитывали время появления и длительность признаков интоксикации, их характер и сроки наступления гибели. Расчет величины среднесмертельной дозы (LD_{50}) рассчитывали по методам Кербера.

Хроническую токсичность препарата изучали на белых мышах живой массой 18–20 г. При выборе доз руководствовались результатами, полученными при изучении острой токсичности, а также учитывали предполагаемую величину терапевтической дозы препарата для сельскохозяйственных животных – 180 мг/кг массы тела. Было взято 2 дозы препарата 900 и 1800 мг/кг массы тела животного, равные 5- и 10-кратным терапевтическим. В каждой опытной группе находилось 10 мышей, которым препарат вводили ежедневно подкожно в течение 10 дней. Животным контрольной 3 группы (10 голов) вводили стерильный изотонический раствор натрия хлорида, в тех же дозах, тем же способом, что и опытным мышам.

В течение всего эксперимента за белыми мышами вели наблюдение, учитывая потребление корма и воды, состояние шерстного покрова, поведение, весовые показатели, местное раздражающее действие. В случае гибели животных в ходе опыта они подвергались вскрытию для установления характера повреждающего действия препарата. Оставшихся в живых мышей (опытных и контрольных) убивали и подвергали патологоанатомическому вскрытию.

Кожно-раздражающее действие препарата изучали на 6 кроликах массой 2,5–3,0 кг. На кожный покров 3-х опытных животных после выстригания шерсти на участок размером 7×8 см в области спины наносили препарат в нативном виде в дозе 20 мг/см². Трём контрольным животным после аналогичной подготовки участка кожи применяли дистиллированную воду в той же дозировке. Наблюдение за кроликами обеих групп первые 8 часов вели ежедневно, а затем каждые сутки на протяжении двух недель.

Изучение сенсibilизирующей (аллергенной) способности препарата проводили на 3 кроликах массой 2,5–3,0 кг. Для этого препарат в нативном

виде наносили путём многократных аппликаций на участок кожи подопытных кроликов размером 2×3 см ежедневно в течение 15 дней в количестве 0,1 мл. Трём контрольным животным наносили дистиллированную воду по аналогичной методике. Затем после 14 дневного перерыва наносили, аналогично, разрешающую дозу испытуемого препарата. Реакцию учитывали в течение 72 часов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования по изучению острой токсичности показали, что после внутрижелудочного введения препарата в дозе 7500 мг/кг массы тела у животных отмечалось кратковременное возбуждение и повышенная двигательная активность, которые исчезали в течение 20–25 минут. Гибели животных не было.

Наноселен в дозах 10000 и 12500 мг/кг массы вызывал признаки кратковременного возбуждения, затем у мышей отмечалась гиподинамия, снижался аппетит и реакция на внешние раздражители. В течение первых суток пало в каждой группе по 1 животному.

Более высокая доза препарата (15000 мг/кг) вызывала выраженную клиническую картину интоксикации. При этом в первые часы отмечен кратковременный период возбуждения, после чего у некоторых мышей наступала гиподинамия, снижался аппетит и реакция на внешние раздражители. В течение первых суток пало 2 животных.

При назначении наноселена в дозе 17500 мг/кг массы период возбуждения у животных данной группы был более коротким, после чего наблюдалась гипо- и адинамия, учащенное дыхание, угнетение, отказ от корма и воды. Три из них к концу опыта пали.

На фоне введения препарата в дозах 20000 и 22500 мг/кг клинические признаки интоксикации усиливались, в течение 36 часов в стадии комы погибло соответственно 5 и 6 животных.

Расчет величины среднесмертельной дозы (LD_{50}) показал, что для белых мышей данный показатель при внутрижелудочном введении наноселена составляет 14166 мг/кг.

При патологоанатомическом исследовании внутренних органов погибших животных установлено кровенаполнение печени и почек, незначительное увеличение в объеме сердца и признаки катарально-геморрагического воспаления в желудочно-кишечном тракте.

В ходе проведения исследований по изучению хронической токсичности препарата выявлено, что у животных опытных (1, 2) и контрольной (3) групп видимых клинических признаков, характерных для отравления, не отмечено на протяжении всего срока наблюдения. Все мыши хорошо потребляли корм и воду. По внешним признакам животные контрольной и опытных групп не отличались между собой: были подвижными, реагировали на внешние раздражители. Шерсть была гладкой, блестящей, кожный покров имел розовой цвета без видимых повреждений, слизистые оболочки глаз оставались влажными, блестящими, розового цвета. Характер испражнений по внешнему виду был характерным для мышей. Масса тела животных в опытных и контрольной группе значительно не различалась и в конце опыта составляла 21,3 – 23,6 г.

Исходя из полученных данных, очевидно, что многократное применение наноселена в 5- и 10-кратной терапевтической дозе хорошо переносится лабораторными животными. Следовательно, граница безопасности, как минимум, в 10 раз превышает терапевтическую дозу препарата.

В результате проведенных исследований на кроликах установлено, что ветеринарный препарат «Наноселен» не обладает раздражающим действием на кожу животных, так как на протяжении всего периода наблюдений не отмечено каких-либо покраснений, припухлостей, болезненности и других изменений. На фоне его применения не выявлено также раздражающего действия препарата на слизистые оболочки и органы зрения, так как покраснения, припухлости, болезненности, расчесов в области конъюнктивного мешка не отмечено.

При изучении на кроликах сенсибилизирующей способности препарата признаки аллергических реакций на его введение отсутствовали.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследований на лабораторных животных установлено, что экспериментальный образец нового ветеринарного препарата «Наноселен» по параметрам острой токсичности согласно ГОСТ 12.1.007-76 может быть отнесен к 4-му классу опасности – веществу малоопасному. В экспериментах по изучению хронической токсичности препарата установлено, что многократное ежедневное парентеральное введение препарата в течение 10 дней в 5- и 10-кратной терапевтической дозе хорошо переносится лабораторными животными, не влияет негативно на их клинический статус и не вызывает макроскопических изменений во внутренних органах. В целом, полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:

1 ЛД₅₀ экспериментального препарата «Наноселен» при внутрижелудочном введении белым мышам составляет 14166 мг/кг, что согласно ГОСТ 12.1.007-76 позволяет его отнести к 4-му классу опасности – веществу малоопасному.

2 Многократное применение препарата в 5- и 10-кратной терапевтической дозе в течение 10 дней хорошо переносится лабораторными животными, существенно не изменяет их клинический статус и не вызывает патологоанатомических изменений во внутренних органах.

3 Препарат не обладает раздражающим действием на кожу и слизистые оболочки и не вызывает аллергических реакций.

ЛИТЕРАТУРА

1 Изменения содержания наноэлементов в сравнении с солями микроэлементов в пробах биоматериала белых мышей / М.П. Кучинский, С.А. Николаенко, С.М. Николаенко, С.Г. Азизбекян // Материалы III международного конгресса ветеринарных фармакологов и токсикологов, посвященного 25-летию проведения (Ленинград, ЛВИ, 1989) регулярных, ежегодных научно-практических форумов по ветеринарной фармакологии, токсикологии и фармации «Эффективные и безопасные лекарственные средства в ветеринарии». – СПб, Издательство ФГБОУ ВПО «СПбГАВМ», 2014. – С. 159–160.

2 Кучинский, М.П. Биоэлементы – фактор здоровья и продуктивности животных: монография / М.П. Кучинский. – Мн.: «Бизнесофсет», 2007. – 371 с.

3 Кучинский, М.П. Распространение селена во внешней среде, его роль в организме животных, последствия дефицита и избытка (Обзор литературы) / М.П. Кучинский // Ветеринарная наука - производству: сб. науч. тр. / РУП «Институт экспе-

риментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»; под науч. ред. А.А. Гусева. – Мн.: РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», 2007. – Т. 39. – С. 169–188.

4 Кучинский, М.П. Современные сведения о физико-химических и биологических свойствах макро- и микроэлементов / М.П. Кучинский // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария. – 2009. – № 2. – 107–116.

5 Кучинский, М.П. Изучение острой токсичности наночастиц кобальта на белых мышах / М.П. Кучинский, С.А. Николаенко, С.М. Николаенко // Материалы II международного конгресса ветеринарных фармакологов и токсикологов, посвященного восьмидесятилетию заслуженного деятеля науки РФ, профессора Соколова В.Д. «Эффективные и безопасные лекарственные средства в ветеринарии». – СПб, Издательство ФГБОУ ВПО «СПбГАВМ», 2012. – С. 159–161.

6 Кучинский, М.П. Профилактическая эффективность экспериментального образца препарата на основе наноэлементов при железодефицитной анемии поросят. / М. П. Кучинский // Сб. научных трудов УО «Гродненский государственный аграрный университет» «Сельское хозяйство – проблемы и перспективы». – Т.25 (Ветеринария), под ред. члена-кор. НАН РБ В.К. Пестиса: / Гродно, ГТАУ, 2014. – С. 162–170.

7 Методические указания по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии // Минск, 2007. А.Э. Высоцкий, М.П. Кучинский, Б.Я. Бирман [и др.].

8 Морфология и биологическая активность наносистем на основе наночастиц селена / С.В. Валуева, С.Г. Азизбеян, М.П. Кучинский, А.Р. Набиуллин // Нанотехника. – 2012. – № 4 (32). – С. 71–72.

9 Разработка и испытания нанопрепаратов для агропромышленного комплекса Беларуси / С.Г. Азизбеян, В.И. Домаш, М.П. Кучинский, А.Р. Набиуллин // Сборник научных трудов «Химия и технология новых веществ и материалов», Вып. 4. 2014, Минск, – С. 109–121.

10 Селен в организме человека: метаболизм, антиоксидантные свойства, роль в канцерогенезе / В.А. Тутельян, В.А. Княжесв, С.А. Хотимченко [и др.] // М.: Изд-во РАМН, – 2002. – 220 с.

УДК 919:616-084:576.89

ИЗУЧЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРЕПАРАТА «ХЕПАВЕТИН»

М.П. КУЧИНСКИЙ¹, Л.Л. КАЛЮТА¹, Т.М. САВЧУК¹,
Г.М. КУЧИНСКАЯ¹, А.М. ПОВЗУН²

¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии
им. С.Н. Вышелецкого», г. Минск, РБ

²Частная ветеринарная клиника, г. Кобрин, РБ

Поступила в редакцию 02.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Острые и хронические заболевания печени у мелких домашних животных довольно часто диагностируются в клинической практике [4]. Первичные гепатиты чаще связаны с отравлениями, а также вирусными инфекциями. Давно известно токсическое влияние на печень фосфор- и хлорорганических соединений, которые используются для борьбы с кожными паразитами и обработки помещений. В их состав входят такие ядовитые компоненты, как диазинон, хлорпирифос, фентион и т. п. [2]. Кроме того, токсическим влиянием на печень обладают многие лекарственные средства, даже при их применении в обычных лечебных дозах. У кошек, в отличие от собак, часто поражается и желчевыводящая система.

В комплексной терапии заболеваний печени определенная роль отводится применению гепатопротекторов. Это группа лекарственных средств, представленная препаратами животного и растительного происхождения, а также эссенциальными фосфолипидами, аминокислотами, витаминами и витаминоподобными соединениями. Из растений достаточно хорошо изученной и давно применяемой в медицине при болезнях печени является расторопша пятнистая (*Silybum marianum*), относящаяся к семейству сложноцветных [11]. Из её семян получают до 30% растительного масла, которое содержит белки, углеводы, каротиноиды, флавоноиды, ферменты, целый комплекс витаминов, а также многие макро- и микроэлементы.

Влияние расторопши на печень связано с наличием флавоноидного комплекса, состоящего из трех гепатопротекторных соединений (силибинин, силикрестин, силидианин), известных под общим названием силимарин [10, 11]. Его содержание в зрелых семенах составляет от 4 до 6%. Флавоноидный комплекс расторопши повышает функциональную активность печени, оказывает мембраностабилизирующее действие, участвует в расщеплении и нейтрализации многих токсикантов организма, стимулирует регенерацию гепатоцитов и антиоксидантную защиту организма. Способность силимарина связывать радикалы и прерывать процессы перекисного окисления липидов во многом связана с его стимулирующим влиянием на уровень в печени восстановленного глутатиона – ключевого компонента трех антиоксидантных систем организма из имеющихся четырех [7]. Представляя собой достаточно простую молекулу в виде трипептида

(комбинацию из трех аминокислот – цистеина, глицина и глутаминовой кислоты), он входит в состав трёх глутатионзависимых ферментов: глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза и глутатионтрансфераза.

Уникальность глутатиона в том, что он способен восстанавливать другие антиоксиданты (витамин С, Е, бетакаротин), которые в результате борьбы со свободными радикалами сами окисляются и становятся опасными для организма. Кроме того, глутатион инициирует выработку в печени детоксикационных ферментов, защищает гепатоциты от повреждений и даже способствует их регенерации. Важная роль природного трипептида заключается в защите сульфгидрильных групп гемоглобина, мембран эритроцитов и иммунных клеток (прежде всего лимфоцитов) от окислителей. Поэтому при истощении запасов глутатиона происходит ослабление детоксикационной способности печени и антиоксидантной защиты, что ведет к снижению функций иммунной системы.

Витамин С играет доминирующую роль во внеклеточной антиоксидантной защите, значительно превосходя в этом отношении глутатион. Он также относится к важнейшим внутриклеточным антиоксидантам [3]. Это объясняется тем, что аскорбат способен легко отдавать два атома водорода, используемых для участия в реакциях обезвреживания свободных радикалов. Важной функцией аскорбиновой кислоты является обезвреживание свободного радикала токоферола (витамина Е), что предупреждает окислительную деструкцию этого главного антиоксиданта клеточных мембран. Кроме того, витамин С необходим для перевода в активное состояние фолиевой кислоты, защиты железа гемоглобина, оксигемоглобина и цитохромов Р₄₅₀ от окисления, т.е. поддержания его в восстановленном состоянии. Аскорбат обеспечивает работу дыхательной цепи митохондрий, являясь донором электронов для цитохрома С, а также способен стимулировать выработку глутатиона [9].

Метилсульфонилметан (МСМ) – это белое кристаллическое вещество органической природы, содержащее более 30% от общей массы серы. МСМ является одним из самых богатых источников данного элемента в природе, обладает противовоспалительной и антиоксидантной активностью. Сера содержится во всех клетках млекопитающих, необходима для развития и поддержания функции соединительных и других видов тканей организма, выработки печенью желчи. Она играет важную роль в клеточном дыхании, ответственна за ионный обмен в клетке [6]. Кроме некоторых аминокислот, серу содержат также и многие другие биологически активные вещества (тиамин, пантотеновая кислота, биотин, липоевая кислота), являющиеся важными элементами метаболических процессов [5, 8].

Цель исследований: изучить лечебную эффективность препарата «Хепаветин» (производитель ООО «ГИГИ», Латвия), состоящего из экстракта расторопши пятнистой, аскорбата и метилсульфанилметана, при заболеваниях печени собак и желчевыводящих путей кошек.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение специфической эффективности препарата «Хепаветин» проведено на собаках и кошках в условиях ветеринарной клиники ИП

Повзун В.М. Кобринского района Брестской области.

Из собак была сформирована группа из 5 особей, проходивших в клинике терапию по поводу бабезиоза. В данную группу были включены животные, у которых на фоне основного заболевания развивалось состояние вторичного гепатита.

Собакам в качестве средства патогенетической терапии гепатита назначали препарат «Хепаветин» из расчета 1 таблетка на 15 кг массы тела, разделяя суточную дозу на 2–3 приема. Длительность курса терапии составила 30 дней, а общая продолжительность наблюдения – 40–60 дней.

Клинический статус собак регистрировали на повторных приемах. Об эффективности проводимой терапии судили на основании результатов физикального осмотра, а также результатов лабораторных исследований. В сыворотке крови подопытных собак определяли активность аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ), гамма-глутамил-трансферазы (ГГТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), содержание общего белка и альбуминов. Образцы крови отбирали до начала терапии, на 14 и 30 дни лечения.

Для проведения испытаний на кошках была сформирована группа из 6 особей с диагнозом «холангиогепатит». Диагноз устанавливали на основании клинических признаков, биохимических тестов и УЗИ органов брюшной полости.

В качестве средства патогенетической терапии животным назначали в течение 30 дней препарат «Хепаветин» из расчета 1 таблетка на 15 кг массы тела, разделяя суточную дозу на 2–3 приема. Общая продолжительность наблюдения за животными группы составила 40–50 дней. Клинический статус регистрировали на повторных приемах, при этом учитывали данные общего физикального осмотра и результаты лабораторных исследований крови.

В сыворотке крови подопытных кошек определяли активность аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ), гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), содержание общего белка и альбуминов. Образцы крови отбирали в первый день (до начала терапии), на 10-й и 30-й дни лечения.

Статистическую обработку цифрового материала проводили на персональном компьютере при помощи программы «StatBiom 2720» с определением средней арифметической (М), ошибки средней (m) и критерия достоверности по Стьюденту (Р). Различия определяли при уровне значимости $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ результатов изучения специфической эффективности препарата «Хепаветин» на собаках показал, что на фоне его применения у животных регистрируется достоверное снижение биохимических маркеров повреждения гепатобилиарной системы (в т.ч. активности АлАТ, АсАТ, ГГТ, ЩФ) и повышение в сыворотке крови концентрации общего белка и альбуминов (таблица 1). После завершения курса терапии биохимические показатели всех собак, участвовавших в опыте, находились в пределах видовой физиологической нормы.

Таблица 1 – Биохимические показатели собак на фоне применения препарата «Хепаветин»

Показатели, ед.измерения	Сроки исследования		
	1-й день	14-й день	30-й день
аланинаминотрансфераза (АлАТ), МЕ/л	265,6±23,01	196,6±10,89*	46,4±3,55**
аспартатаминотрансфераза (АсАТ), МЕ/л	211,8±30,67	164±17,92	33,4±2,78*
гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ), МЕ/л	21,8±1,46	14,6±1,03*	3,6±0,42*
щелочная фосфатаза (ЩФ), МЕ/л	117,4±13,58	95,8±15,38*	32,6±2,98*
общий белок, г/л	50,4±1,11	54,2±1,10	60,6±1,40**
альбумины, г/л	20,7±0,66	24,0±0,58	28,4±0,98*

Примечание – *, **достоверность различий по сравнению с первым днем исследования при уровне значимости $P<0,05$

Улучшение клинического состояния (в т.ч. исчезновение желтушности слизистых, восстановление аппетита и активности) регистрировали на 7–14 дни терапии собак.

Испытания на кошках показали, что на фоне применения хепаветина у животных опытной группы на 5–7 день лечения регистрировали улучшение клинического состояния, в т.ч. исчезновение желтушности слизистых, рвоты и анорексии, повышение активности. Данные клинического обследования коррелировали с показателями лабораторных скрининговых тестов (таблица 2). Так, при лабораторном исследовании сыворотки крови уже на 10 день терапии регистрировали достоверное уменьшение активности АлАТ, АсАТ и ГГТ, что свидетельствует о затухании или отсутствии воспалительных процессов в печени и желчевыводящих протоках. Как положительные биохимические изменения следует также отметить повышение в сыворотке крови концентрации общего белка и альбуминов. После завершения курса терапии анализируемые показатели сыворотки крови всех кошек, участвовавших в опыте, укладывались в пределы стандартных интервалов, установленных для данного вида животных.

Таблица 2 – Биохимические показатели кошек на фоне применения препарата «Хепаветин»

Показатели, ед. измерения	Сроки исследования		
	1-й день (до начала лечения)	10-й день терапии	30-й день терапии
Аланинаминотрансфераза (АлАТ), МЕ/л	229,2+28,42	183,8+17,22*	83,6+4,07**
Аспаратаминотрансфераза (АсАТ), МЕ/л	183,8+6,88	147,2+7,68*	30,8+3,50*
Гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ), МЕ/л	14,2+1,30	11,2+0,95*	1,6+0,20
Щелочная фосфатаза (ЩФ), МЕ/л	147,6+9,16	119,4+8,37	18,0+2,13*
Общий белок, г//л	49,6+1,08	51,8+0,87	62,0+1,91**
Альбумины, г/л	20,4+0,76	21,8+0,94	28,4+1,33*

Примечание – *, ** достоверность различий по сравнению с первым днем исследования при уровне значимости $P < 0,05$

Побочных реакций и осложнений на фоне применения испытуемого препарата собакам и кошкам зарегистрировано не было.

ВЫВОДЫ

Препарат «Хепаветин», состоящий из экстракта расторопши пятнистой, метилсульфанилметана и витамина С, оказывает лечебное действие при вторичных гепатитах собак.

Хепаветин эффективен при лечении кошек, больных холонгиогепатитами.

При применении мелким домашним животным в рекомендуемых дозах испытуемый препарат не вызывает побочных явлений и осложнений.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Влияние микро-, макроэлементов и витаминов на иммунную систему животных // Иммунокоррекция в клинической ветеринарной медицине: монография / П.А. Красочко [и др.]; под ред. П.А. Красочко. – Мн.: Техноперспектива, 2008. – 507с.
- 2 Ганн-Мур, Д. Воспалительные болезни печени кошек : обзор / Д. Ганн-Мур, Н.Рид // *Veterinary Focus*. – 2010. – №20. – Р. 2–8.
- 3 Горбачёв, В.В. Витамины, микро- и макроэлементы. справочник / В.В. Горбачёв, В.Н. Горбачёва. – Мн.: Книжный дом, Интерпрессервис, 2002. – 544 с.
- 4 Джерман, Э. Холангит кошек / Э. Джерман // *Veterinary Focus*. – 2009. – №19. – Р. 41–46.
- 5 Кучинский, М.П. Биоэлементы - фактор здоровья и продуктивности животных: монография / М.П. Кучинский. – Мн.: Бизнесофсет, 2007. – 372 с.
- 6 Кучинский, М.П. Препараты на основе биоэлементов для терапии и профилактики болезней минеральной недостаточности сельскохозяйственных животных: дис. д-ра вет. наук: 06.02.01 и 06.02.03 / М. П. Кучинский. – Мн., 2010. – 303 с.
- 7 Лавренов, В. К. Полная энциклопедия лекарственных растений / В. К. Лавренов, Г. В. Лавренова. – СПб.: Нева; М.: ОЛМА-ПРЕСС. 1999. – Т.2. – 815 с.

8 Методические рекомендации по применению животным новых препаратов на основе микроэлементов и витаминов / М.П. Кучинский [и др.] // – Мн.: РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», 2015. – 12 с.

9 Морозкина, Т.С. Витамины: краткое руководство для врачей и студентов медицинских, фармацевтических и биологических специальностей / Т.С. Морозкина, А.Г. Мойсеев. – Мн.: ООО «Асар», 2002. – 112 с.

10 Попов, В.И. Лекарственные растения / В.И. Попов, Д.К. Шапиро, И.К. Данусевич. – 2-е изд. перераб. и доп. – Мн.: Полымя, 1990. – 304 с.

11 Фармакология, биологические свойства и медицинское применение экстракта расторопши пятнистой / В.У. Буко и [др.]. Рецепт. – 2009. – №6 (68). – С.110–118.

УДК 619:616.72-002.78:636.5.034

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА «УРАМИН» ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО СМОДЕЛИРОВАННОЙ ПОДАГРЕ У ПТИЦ

О.В. МИЛОСТА², И.В. НАСОНОВ¹, Р.П. ЛИЗУН¹,
С.М. ЯКУБОВСКИЙ¹, Л.Т. ВОЛЧЕК¹

¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии
им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, РБ

²УО «Гродненский государственный аграрный университет», г. Гродно, РБ

Поступила в редакцию 16.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

В списке болезней незаразной этиологии, наносящих урон промышленному птицеводству, мочекаменный диатез (подагра, висцеральная подагра, мочекаменная болезнь) занимает одно из первых мест, уступая только алиментарной дистрофии и гиповитаминозам. Чаще всего болеют куры яичного типа в возрасте 100–180 дней и куры высокопродуктивных кроссов. Причем среди причин падежа птицы смертность от подагры составляет до 20 %.

Заболевания мочевыводящей системы у птиц обусловлены факторами различной этиологии, среди которых наиболее важными являются факторы алиментарного характера, связанные с недостаточностью витаминов, в частности, витамина А, избыточным потреблением кальция, протеиновым или аминокислотным дисбалансом, воздействием микотоксинов, а также факторами вирусной этиологии, обусловленной нефротропными штаммами вируса инфекционного бронхита.

Причиной нарушения функции почек у кур часто является недостаток витаминов В₆ или В₁₂ в кормах, а также воздействие вредных для организма химических соединений, в частности, протрава для зерна, бикарбонат или гидрокарбонат натрия, эндотоксины микроорганизмов и, прежде всего, грибов.

Экономический ущерб, причиняемый этой патологией, определяется замедлением роста молодняка, низкой оплатой корма, потерей живой массы,

снижением яйценоскости и инкубационных свойств яиц, гибелью птицы, вынужденным убоем, утилизацией тушек с признаками висцеральной формы заболевания.

Широкое распространение и ущерб, наносимый этим заболеванием, выдвигают разработку новых способов его фармакопрофилактики в число актуальных вопросов ветеринарной медицины.

В настоящее время не существует ветеринарных препаратов, разработанных именно для профилактики и лечения подагры у птиц. Основное лекарственное средство, используемое массово в промышленном птицеводстве при подагре (в частности) птиц, – это пищевая сода, которую добавляют в комбикорм из расчета 3 кг на тонну или дают в виде 0,2 % раствора.

Однако следует учитывать, что введение в больших количествах ионов натрия, содержащихся в пищевой соде, может сильно влиять на кислотно-щелочное равновесие, а также нарушать калий-натриевый баланс.

Целью наших исследований являлось определение эффективности нового комплексного препарата «Урамин» для лечения и профилактики заболеваний мочевыводящей системы птиц при экспериментально смоделированной подагре.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Препарат состоит из смеси калиевых и натриевых солей, лимонной кислоты и биологически активных веществ, улучшающих трофические процессы в почках (L-аргинин). В качестве антислеживающей добавки была внесена лактоза в количестве 16%. Биодоступность компонентов препарата при этом приближается к 100%. Это мелкокристаллический белый порошок без запаха, хорошо растворим в воде.

Цитраты практически полностью подвергаются метаболическому распаду, что исключает возможность кумуляции действующих веществ в мясе или яйце птицы. Лишь 1,5–2 % начальной дозы выявляют в моче в неизменном виде. При длительном применении суточная экскреция натрия и калия равняется суточному приему. Значимых изменений газового состава крови и электролитов плазмы крови не отмечается. Это свидетельствует о том, что благодаря почечной регуляции кислотно-щелочное равновесие организма остается стабильным и при сохранённой функции почек возможность кумуляции натрия или калия исключается.

Аминокислота L-аргинин является единственным индуктором нитрооксид-синтетазной системы, которая отвечает за тонус сосудов сердца, печени, почек; активирует клеточный метаболизм, обмен мочевины, способствует обезвреживанию и выведению аммиака, стимулирует высвобождение гормона роста из гипофиза; регулирует уровень сахара в крови и уменьшает молочнокислый ацидоз, переводит метаболизм на аэробный путь; проявляет ноотропную активность, препятствует стрессовым изменениям в обмене медиаторных аминокислот, повышает фосфорилирование ряда белков в ЦНС. L-аргинин быстро абсорбируется из ЖКТ, проходит гистогематические барьеры и распределяется во все органы и ткани. Частично утилизируется в процессах метаболизма, оставшаяся часть выводится почками (преимущественно).

Таким образом, с учетом многоцелевого действия данной незаменимой

кислоты препарат будет оказывать положительное влияние на регуляцию метаболизма мочевой кислоты, а также правильный баланс между ее синтезом и почечной экскрецией.

Для моделирования процесса подагры у кур в условиях эксперимента использовали молодняк (петушки) яйценосной птицы 70–90-дневного возраста. В качестве препарата-провокатора – диклофенак натрия в таблетках в дозе 5 мг/кг живой массы, разведенный на 1% растворе микрокристаллической целлюлозы, применяемый в течение 5 дней. Данная доза и длительность применения позволяет вызвать у птиц стойкое достоверное повышение мочевой кислоты без развития признаков тяжелой интоксикации и падежа.

Для выполнения поставленной задачи на виварии по принципу аналогов было сформировано 5 групп 90-дневных петушков по 7 голов в каждой: 4 опытные и 1 контрольная. Всем опытным птицам индивидуально через зонд производилась выпойка препарата «Диклофенак натрия» на 1% микрокристаллической целлюлозе в дозе 5 мг/кг ж.м. в сутки в течение 5 дней. Контрольная птица не подвергалась манипуляциям. До начала опыта у птиц была отобрана фоновая кровь для биохимического исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В течение периода интоксикации у птиц отмечалась жажда и сниженный аппетит, на вторые сутки – незначительная проходящая диарея мочевыми солями с геморрагиями. Падежа за весь период отмечено не было.

После окончания периода моделирования подагры у птиц всех групп была отобрана кровь для определения уровня мочевой кислоты.

Результаты представлены в таблице 1.

карственного средства, уровень мочевой кислоты у птиц опытной группы колебался от 99,69 до 1772 мкмоль/л, что еще раз подтверждает разную индивидуальную чувствительность птицы к интоксикации диклофенаком.

По клиническим признакам и достоверному увеличению мочевой кислоты был поставлен диагноз «начальная степень подагры» и начато лечение разработанным препаратом «Урамин».

Для отработки эффективной лечебной дозы 4-м подопытным группам птиц продолжили ежедневное введение диклофенака натрия в дозе 5 мг/кг

Таблица 1 – Моделирование подагры диклофенаком (5 мг/кг) у цыплят кур-несушек (петушки)

Группа	Препарат	Мочевая кислота, мкмоль/л	Общий белок, г/л	Креатинин, мкмоль/л
группа 1	Диклофенак 5 мг/кг ж.м.	575,3±148*	48,9±1,3	42,6±3,2
группа 2				
группа 3				
группа 4				
группа 5 (контроль)	без манипуляций	95,6±11,1	48,4±2	36±1,5

Примечание – *достоверно к контролю, $P < 0,05$

Биохимический анализ крови показал достоверное увеличение уровня мочевой кислоты (в 6 раз) в опытной группе и тенденцию к увеличению креатинина. Следует отметить, что, несмотря на одинаковые условия приема ле-

ж.м. и одновременно с этим выпаивали препарат «Урамин» в следующих суточных дозировках:

группа 1 – 0,5 г/кг ж.м.

группа 2 – 0,4 г/кг ж.м.

группа 3 – 0,3 г/кг ж.м.

группа 4 – на фоне интоксикации диклофенаком не получала лечебную добавку «Урамин», являлась положительным контролем (К+). Группа 5 не подвергалась никаким манипуляциям, являлась отрицательным контролем (К-).

Препарат «Урамин» 1 раз в сутки в нужных дозировках растворяли в 1,0 литре питьевой воды и свободно выпаивали подопытной птице в течение 2-х часов. После поилки наполнялись чистой питьевой водой. Препарат применялся 6-дневным курсом.

По окончании курса лечения у птицы всех групп была отобрана кровь для биохимического исследования. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Эффективность препарата «Урамин» при экспериментально смоделированной подагре птиц.

Показатели	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
	0,5 г/кг	0,4 г/кг	0,3 г/кг	К+ (диклофенак)	К- (пит.вода)
мочевая кислота, мкмоль/л	150,1±15,1* (-24,8%)	122,4±21* (-38,7%)	174,6±35,7 (-12,6%)	199,7±8,2	155,9±27,9
общий протеин, г/л	46,1±0,9	44,2±1,7	43,6±2,3	45,9±0,8	44,4±1,3
креатинин, мкмоль/л	38,5±1,6	34,5±1,2	34,7±3,2	36,4±3,4	34,4±0,9
глюкоза, ммоль/л	10,1±0,5**	9,4±0,3**	9,7±0,6**	10,6±0,4**	12,8±0,3
холестерин, ммоль/л	3,8±0,2	3,4±0,4	3,2±0,4	3,6±0,3	3,9±0,1
АСТ, У/л	154,6±12*	133,8±8,5	134,8±13,7	119,6±4,5	134,3±8,6
Са, ммоль/л	3,4±0,1	3,1±0,2	3,3±0,5	3,6±0,1	3,3±0,2
Р, ммоль/л	1,2±0,1	2,3±0,2*,**	2,2±0,2*,**	1±0,1	1,2±0,1
Са:Р	2,8	1,4	1,5	3,6	2,8

Примечание – *достоверно по отношению к 4 группе (К+), P<0,05;
**достоверно по отношению к 5 группе (К-), P<0,05

Как видно из таблицы 2, применение препарата «Урамин» при подагре птиц имеет дозозависимый эффект. Наиболее эффективной оказалась доза 0,4 г/кг ж.м. (достоверное снижение мочевой кислоты на 38,7% по сравнению с положительным контролем). Также эффективной оказалась максимальная доза 0,5 г/кг ж.м. (достоверное снижение мочевой кислоты на 24,8% по сравнению с положительным контролем). При наименьшей дозе 0,3 г/кг ж.м. уровень мочевой кислоты имеет тенденцию к снижению на 12,6%.

Следует отметить пониженный уровень глюкозы во всех группах птиц, получавших диклофенак, а также достоверно повышенное содержание фосфора в крови во второй и третьей группах. В первой группе (0,5 г «Урамина» на кг ж.м.), соотношение кальция и фосфора было аналогичным, как в 5-й группе (отрицательный контроль), что свидетельствует об оптимальном минеральном обмене при данной дозировке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1 Выпойка препарата «Диклофенак натрия» на 1% микрокристаллической целлюлозе в дозе 5 мг/кг ж.м. в сутки в течение 5 дней вызывает достоверное увеличение мочевой кислоты (в 6 раз) и клинические признаки начальной стадии подагры.

2 Рекомендуемая суточная лечебно-профилактическая доза «Урамина» составляет 0,4–0,5 г/кг ж.м. свободной выпойкой 6–7-дневным курсом, далее – под контролем уровня мочевой кислоты.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Бессарабов, Б.Ф., Мельникова, И. Подагра (мочекислый диатез) / Б.Ф. Бессарабов, И. Мельникова // *Птицеводство*, 2001. – №5. – С. 27–29.
- 2 Кузьмин, А.В. Мочекислый диатез у кур / А.В. Кузьмин // *Ресурсосберегающие экологически безопасные технологии получения с/х продукции* / Мордов. гос. ун-т. – Саранск, 2006. – С.195–199.
- 3 Лимаренко, А.А. Болезни сельскохозяйственных птиц: Справочник: учеб. для вузов / А.А. Лимаренко [и др.]; под ред. А.А. Лимаренко – СПб.: Издательство «Лань», 2005. – С. 221–225.
- 4 Петрунь, Л.М. Подагра курей: механізм, лікування. / Л.М. Петрунь // *Ефективне птахівництво та тваринництво*. – 2004. – № 1. – С. 24–28.
- 5 Якименко, Н., Алексеева, С. Мочекислый диатез: причины возникновения / Н. Якименко, С. Алексеева // *Птицеводство*. – 2001. – №6. – С.45–46.
- 6 Uma, CA, Vijayasarithi, SK, Nalini, TS, Satyanarayana, ML, Rao, S. Pathology of gout in poultry. *Indian J Vet Pathol*. 1999;23:94–5.
- 7 Bailey, J. L., *Techniques in protein chemistry*. Amst, 1962. – p. 23.
- 8 Patel, AK, Ghodasara, DJ, Dave, CJ, Jani, PB, Joshi, BP, Prajapati, KS. Experimental studies on etiopathology of visceral gout in broiler chicks. *Indian J Vet Pathol*. 2007;31:24–8.
- 9 Rao, TB, Das, JH, Sharma, DR. An outbreak of gout in East Godavari District Andhra pradesh. *Poultry Adviser*. 1993;26:43–5.

УДК:615.24:636.2

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА «ГЕПАТОДЖЕКТ» НА СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ ЛАКТИРУЮЩИХ КОРОВ

А.А. ВОИНОВА, С.П. КОВАЛЕВ

*ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная
академия ветеринарной медицины», г. Санкт-Петербург, РФ*

Поступила в редакцию 01.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Болезни печени занимают одно из первых мест среди патологий, встречающихся у высокопродуктивных животных. Содержание большого количества животных на ограниченной площади, нехватка моциона, скормливание недоброкачественных кормов и избыток концентратов в рационе продуктивных животных приводят к нарушению обмена веществ и негативно сказываются на функциональном состоянии печени – «главного фильтра» организма [1,2]. В связи с этим у коров возникают серьезные патологии – токсический и жировой гепатозы.

В настоящее время ведется поиск эффективных препаратов, способствующих снижению токсической нагрузки на печень, а так же изучение и разработка способов профилактики гепатозов у крупного рогатого скота.

В связи с вышесказанным были проведены исследования по оценке влияния комплекса аминокислот, входящих в состав препарата «Гепатоджект» на функциональное состояние печени коров черно-пестрой (голландизированной) породы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в одном из хозяйств пригородной зоны Санкт-Петербурга. В состав исследуемого препарата «Гепатоджект» входят: L-аргинин – стимулирует процесс клеточного метаболизма, регулирует уровень сахара в крови, способствует обезвреживанию и выведению аммиака, снижает молочнокислый ацидоз; L-орнитин – участвует в орнитиновом цикле мочевинообразования Кребса, снижает в организме животного уровень аммиака, активизирует белковый обмен; L-цитрулин – способствует процессу образования и выведения из организма мочевины.

Для исследования были отобраны две группы лактирующих коров (подопытная и контрольная). Животных отбирали по принципу аналогов, учитывались биохимические и клинические показатели крови. Коровы подопытной и контрольной группы содержались в равных условиях, соответствующих зоогигиеническим требованиям. В подопытную группу входили животные, которым внутривенно вводился препарат «Гепатоджект» в дозе 100 мл 1 раз в день 5 дней подряд; животные контрольной группы лечения не получали. Ежедневно проводили оценку клинического состояния коров. Через 7 дней после последнего введения исследуемого препарата от живот-

ных, находившихся в опыте, были отобраны образцы крови и проведено их биохимическое и клиническое исследование. Кроме того, во время вынужденного убоя от нескольких животных из подопытной и контрольной групп были получены образцы печени, которые были направлены на гистологическое исследование. Материал для гистологического исследования фиксировали в 95% растворе этилового спирта в течение 24 часов, после чего по общепринятой методике заливали в парафин [3,4]. Затем изготавливали срезы толщиной 5–7 мкм. Полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а также Шифф-йодной кислотой по Мак-Манусу для выявления гликогена. Микрофотографирование проводили при помощи цифровой фотокамеры Axio Scope A1 (Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате проведенных исследований получены данные, представленные в таблице, из которой видно, что у коров подопытной группы в процессе лечения произошло достоверное увеличение концентрации общего белка на 18,4%. В то же время у коров контрольной группы уровень общего белка повысился только на 10,7%. При анализе содержания мочевины крови у животных, находящихся в подопытной группе, отмечалось достоверное снижение этого показателя на 43,9% в то время, как у коров контрольной группы этот показатель был достоверно выше исходного показателя.

Таблица – Некоторые показатели биохимического и морфологического состава крови коров ($M \pm m$)

Показатель	до опыта		после опыта	
	контрольная группа	подопытная группа	контрольная группа	подопытная группа
общий белок (г/л)	67,14±9,4	71,9±7,9	74,3±8,0	85,1±6,7*
мочевина (ммоль/л)	6,09±0,6	6,25±1,1	6,96±0,9	5,38±0,7
эритроциты (Т/л)	5,07±0,6	5,22±0,45	5,7±0,48	6,38±0,3
лейкоциты (Г/л)	9,7±2,2	9,6±1,6	9,74±1,36	10,59±0,97
гемоглобин (г/л)	88,2±13,4	91,4±4,5	92±3,7	97,2±2,3

Примечание –* $p < 0,05$

Исследование морфологического состава крови у коров подопытной группы показало недостоверное повышение количества лейкоцитов на 10,3%, эритроцитов на 22,2%, в контрольной группе эти показатели имели тенденцию к возрастанию и увеличились на 0,4% и 12,4% соответственно.

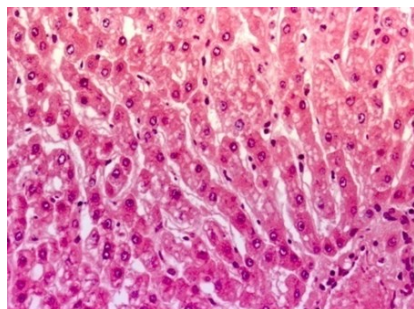


**Рисунок 1 – Срез печени №1.
Окраска гематоксилин-эозин.
Ув. 200**

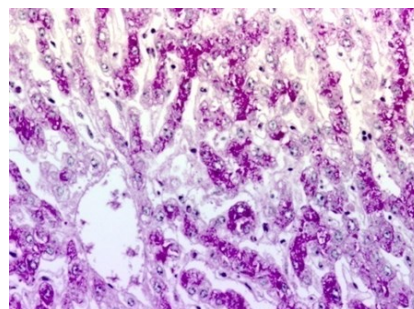


**Рисунок 2 – Срез печени №1.
Шик-реакция. Отмечается высокое
содержание гликогена
в гепатоцитах. Ув. 200**

Уровень гемоглобина у животных в опыте имел тенденцию к возрастанию и увеличился на 6,3%, в то же время этот показатель у контрольных повысился на 4,3%. Результаты гистологического исследования печени животного подопытной группы представлены на рисунках 1 и 2, контрольной – 3 и 4.

В образце печени под номером 1 микроструктура органа практически соответствовала норме. Печень имела преимущественно упорядоченное балочное строение, была умеренно полнокровна.

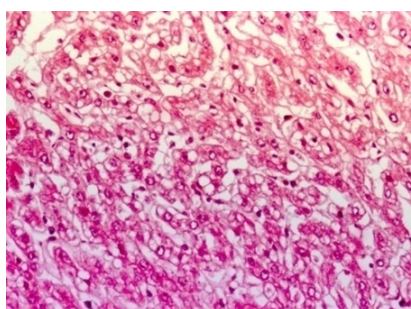


**Рисунок 3 – Срез печени №4.
Умеренный стеатоз и
незначительное расширение
пространств Диссе. Окраска
гематоксилин-эозин. Ув. 200**

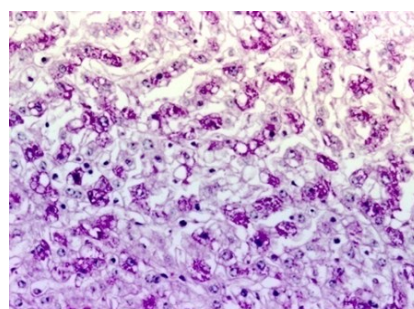


**Рисунок 4 – Срез печени №4.
Шик-реакция. Снижение
содержания гликогена
в гепатоцитах. Ув. 200**

В образце под номером 4 на фоне указанных дистрофических и функциональных изменений отмечалось также умеренное расширение синусоидальных пространств Диссе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что при внутривенном введении гепатопротектора «Гепатоджект» у коров отмечается нормализация белкового обмена. Количество общего белка у коров подопытной группы до проведения опыта составляло 60,82 г/л, а после проведения опыта – 85,1 г/л. Имеется тенденция к понижению уровня билирубина и мочевины в сыворотке крови, которые до проведения опыта составляли 4,17 ммоль/л и 6,25 ммоль/л, а после 2,34 ммоль/л и 5,38 ммоль/л соответственно. Также у животных подопытной группы отмечено увеличение количества эритроцитов и гемоглобина: на 22,2% и 6,3% соответственно, что, вероятно, связано с восстановлением функции печени и детоксикационными свойствами препарата.

При гистологическом исследовании печени, полученной от животного, которому вводился препарат «Гепатоджект», было установлено, что микроструктура органа практически соответствовала норме, в то время как в образце, полученном от животного контрольной группы, видны явные отклонения от нормы, в том числе и признаки жировой дистрофии.

По результатам данного исследования можно сделать вывод, что действие препарата «Гепатоджект» оказывает положительное влияние на ряд показателей, характеризующих состояние печени у лактирующих коров. Однако дальнейшие исследования позволят более детально изучить воздействие препарата на организм животных.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Воинова, А.А. Клиническая оценка применения препарата «Гепатоджект» у телят / А.А. Воинова, М.М. Леоненко, А.Б. Бикмуллина, Л.А. Кудесов // *Материалы 68-й международной научной конференции молодых ученых и студентов СПб ГАВМ.* – Издательство ФГБОУ ВПО «СПбГАВМ», 2014г. – С. 29.
- 2 Воинова, А.А. Сравнительная характеристика функционального состояния коров разного направления продуктивности / А.А. Воинова // *Материалы 69-й международной научной конференции молодых ученых и студентов СПб ГАВМ.* – Издательство «СПб ГАВМ», 2015г. – С. 14.
- 3 Мужикян, А.А. Особенности гистологической обработки органов и тканей лабораторных животных / А.А. Мужикян, М.Н. Макарова, Я.А. Гуцин // *Международный вестник ветеринарии.* – 2014 – № 2. – С. 103–109.
- 4 Гуцин, Я.А. Влияние различных методов эвтаназии на гистологическую картину легких мелких лабораторных животных / Я.А. Гуцин, А.А. Мужикян, // *Международный вестник ветеринарии.* – 2014 – № 4. – С. 96–104.

УДК 619:618.19-002:636.2.034

**ВЛИЯНИЕ ПРЕБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА
«ВАМИ-ЛАКТУЛОЗА» НА КАЧЕСТВЕННЫЕ
ПОКАЗАТЕЛИ МОЛОКА КОРОВ**

Т.Н. КАМЕНСКАЯ¹, С.А. ЛУКЬЯНЧИК¹, И.И. КУЗЬМИНСКИЙ¹,
О.В. ХЕНДОГИНА¹, А.И. КАЗИНЕЦ², О.Г. ГАЛУШКО²

¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышесесского»,
г. Минск, РБ

²РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству»,
г. Жодино, РБ

Поступила в редакцию 07.08.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Скопление большого количества животных на ограниченных площадях, круглогодичное пребывание их в закрытых помещениях, использование кормов промышленного производства и некоторые другие процессы нередко вызывают у животных ухудшение здоровья, глубокие нарушения обмена веществ и, как следствие, снижение продуктивности. В таких условиях основным связующим звеном организма животных с природой остается корм [1].

Современная технология производства продукции животноводства невозможна без сбалансированного кормления. Нестабильность кормовой базы, дефицит и высокая стоимость премиксов и кормовых добавок, необходимых для нормализации физиологических процессов и обмена веществ в организме, стимулируют поиск местных и более дешевых источников витаминно-минеральных добавок для сельскохозяйственных животных [1, 2].

Перспективным направлением улучшения полноценности рационов является включение в их состав препаратов пробиотического, пребиотического и симбиотического действия.

Пребиотики – углеводы с низким содержанием молекул, которые соединены друг с другом бета-гликозидными связями. В них отсутствует фермент, способствующий расщеплению. По этой причине пребиотики, попадая в желудок, не перевариваются. Они попадают в кишечник и там расщепляются, выступая пищевыми субстратами. Пребиотики стимулируют рост полезной микрофлоры и укреплению иммунитета. Наиболее эффективными препаратами, которые выступают пищевыми субстратами, считаются те, которые содержат в своем составе лактулозу. Она признана самым эффективным пребиотиком. Разлагаясь, лактулоза не только приводит к увеличению численности полезных бактерий, но и способствует выведению вредных веществ [3].

Новая лактулозосодержащая кормовая добавка комплексного действия «ВАМИ-Лактулоза» с пребиотическими свойствами была разработана сотрудниками опытно-экспериментальной научно-производственной лаборатории кормовых добавок и биопродуктов РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству» и изготовлена на основе трепела место-

рождения «Стальное» Хотимского района Могилевской области с включением концентрата лактулозы и солей микроэлементов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Опыты по скармливанию лактирующим коровам в рационах пребиотического препарата «ВАМИ-Лактулоза» проводили сотрудники РУП «Научно-практический центр национальной академии наук Беларуси по животноводству» на базе ГП «ЖодиноАгроПлемЭлита» Смолевичского района Минской области. Новую пребиотическую добавку «ВАМИ-Лактулоза» вводили в состав комбикорма в количестве 0,5 % от массы комбикорма и скармливали животным в течение 120 дней. В конце опыта были отобраны пробы молока для проведения лабораторных исследований. Контрольная группа коров получала комбикорм, производимый в хозяйстве, без использования кормовой добавки «ВАМИ-Лактулоза».

В молоке определяли органолептические (цвет, консистенция, запах), физико-химические (титруемая кислотность, плотность), микробиологические показатели (общая микробная обсемененность), количество соматических клеток согласно СТБ 1598-2006 «Молоко коровье. Требования при закупках» и Изменения № 1 к СТБ 1598-2006.

Ингибирующие свойства молока исследовали согласно ГОСТ 23-454-79 с использованием культуры *Streptococcus thermophilus*.

Биологическую ценность и безвредность молока коров, находившихся в опыте, исследовали согласно «Методическим указаниям по токсикологической оценке мяса, мясных продуктов и молока с использованием инфузорий тетрахимена-пириформис» (утв. ГУВ МСХП РБ, 1997г).

При изучении безвредности учитывали изменения морфологической структуры простейших, характер их движения и наличие мертвых форм через 1, 2, 4, 8 и 24 часа инкубации. Хроническую безвредность определяли по тем же показателям с учетом роста и развития через 96 часов культивирования тест-организмов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Установлено, что по внешним признакам молоко от коров подопытных групп представляло собой однородную жидкость белого цвета, без осадка и хлопьев. Запах свойственный коровьему молоку, постороннего запаха не выявлено (таблица 1).

Таблица 1 – Физико-химические показатели молока коров, получавших в рационах пребиотический препарат «ВАМИ-Лактулоза»

№ п/п	№ пробы, группа	Показатели	Норма для молока класса «экстра»	Фактические данные
1	M±m контроль	цвет	белый или белый с желтоватым или кремовым оттенком	белый
2	M±m опыт			
3	M±m контроль	консистенция	однородная жидкость без осадка, сгустков хлопьев белка	однородная жидкость без осадка, сгустков хлопьев белка
4	M±m опыт			
5	M±m контроль	запах	чистый, свойственный коровьему молоку, без посторонних запахов	чистый, свойственный коровьему молоку, без посторонних запахов
6	M±m опыт			
7	M±m контроль	титруемая кислотность, °Т	от 16 до 18 включит.	16,50±0,36
8	M±m опыт			16,33±0,39
9	M±m контроль	плотность, кг/м³	1028,0	1028,75±0,27
10	M±m опыт			1028,67±0,39
11	M±m контроль	общее количество микроорганизмов, КОЕ/см³	*	1,42±0,16 x 10 ⁵
12	M±m опыт			—
13	M±m контроль	реакция с беломасином	отрицательная	—
14	M±m опыт			—
15	M±m контроль	количество соматических клеток в 1 см³, не более	3 x 10 ⁵	4,95±0,38 x 10 ⁵
16	M±m опыт			1,30±0,12 x 10 ⁴
17	M±m контроль	наличие ингибирующих веществ	отсутствуют	—
18	M±m опыт			—

Примечание – *показатель общего количества микроорганизмов для молока высшего сорта – до 300 тыс. включительно

Как видно из таблицы 1, качественные показатели молока коров опытной группы соответствовали молоку сорта «экстра». Так количество соматических клеток колебалось в пределах 11 000–15 000 в 1см³, плотность молока (кг/м³) составила 1028,67±0,39, титруемая кислотность (°Т) – 16,33±0,39. Постановка реакции на мастит беломасиновой пробой дала отрицательный результат во всех пробах молока.

Ингибирующих веществ во всех исследуемых пробах молока в реакции с тест-культурой стрептококком термофильным не выявлено.

При изучении безвредности проб молока на инфузориях тетрахимена пириформис изменений в структуре и двигательной активности простейших через 1, 2, 4 и 24 часа не установлено, что свидетельствует о безвредности продукта. Биологическая ценность молока опытной группы, относительно контрольной группы, в среднем, по двум опытам составила 106,3 % (таблица 2).

Таблица 2 – Биологическая ценность молока коров, получавших в рационах пребиотический препарат «ВАМИ-Лактулоза»

Группа	1-е исследование		2-е исследование		Средние показатели	
	клеток	%	клеток	%	клеток	%
I (опытная)	298	106,8	308	105,8	303	106,3
II (контроль)	279	100,0	292	100,0	285	100,0

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1 Молоко коров, получавших в рационах пребиотический препарат «ВАМИ-Лактулоза» в составе комбикорма по органолептическим, физико-химическим и санитарным показателям является доброкачественным, соответствует сорту «экстра».

2 Молоко коров в течение 24 ч не оказывало токсического действия на простейших (тетрахимена пириформис), отклонений в морфологической структуре, характере движения, росте и развитии простейших не наблюдалось, что свидетельствует о его безвредности.

3 Биологическая ценность молока коров, получавших в рационах пребиотический препарат «ВАМИ-Лактулоза», относительно контрольной группы, в среднем, по двум опытам составила 106,3%.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Сидоров, М.А. Нормальная микрофлора животных и ее коррекция пробиотиками / М.А. Сидоров, В.В. Субботин //Ветеринария. – 2001. – №11. – С.17–22.
- 2 Горбатова, К.К. Биохимия молока и молочных продуктов: учеб. Пособие / К.К. Горбатова //–3-е изд., перераб. Идоп.-СПб.: ГИОРД, 2001.
- 3 Синельников, Б.М. Лактоза и её производные / Б.М. Синельников [и др.]// науч.ред. акад. РАСХН А.Г. Храмцов-СПб: Профессия, 2007.– С.582–602.

УДК 619:618.211

СРЕДСТВО КОРРЕКЦИИ ГИПОФУНКЦИИ ЯИЧНИКОВ У КОРОВ

И.И. КУЗЬМИНСКИЙ, А.В. ЛИЛЕНКО, А.Г. БОТЯНОВСКИЙ

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского»,
г. Минск, РБ*

Поступила в редакцию 21.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

В связи с повышением молочной продуктивности дойного стада проблема управления процессами размножения животных на современных молочных фермах приобретает особую актуальность. В настоящее время в животноводстве остро обозначилась проблема бесплодия коров. Ежемесячное первичное осеменение в хозяйствах составляет в среднем 40–50%, а оплодотворяемость – 35–40% (Ивашкевич О.П., 2008), так как у половины животных воспроизводительная функция угнетена вследствие воздействия ряда неблагоприятных факторов (неполноценное и недоброкачественное кормление, нарушение зоогигиенических норм содержания и эксплуатации животных) в послеродовом периоде, которые вызывают нарушения обмена веществ, эндокринную недостаточность и гормональные расстройства, снижение резистентности организма. В структуре гинекологических болезней наибольший удельный вес занимают функциональные нарушения яичников, в том числе: персистенция желтого тела яичников (10,6–24,5%), поддающаяся лечению препаратами лютеолитического действия (Грига Э.Н., 2003) и гипофункция яичников (14,6–27,1%), характеризующаяся нарушением развития и созревания фолликулов, их овуляции и образования желтого тела. Данная патология может проявляться в виде персистенции фолликула и задержки овуляции, ановуляторного полового цикла, гипоплазии и недостаточной функции желтого тела, образующегося на месте коагулировавшего фолликула или полной депрессии функции половых желез, клинически сопровождающейся анафродизией, т.е. отсутствием половых циклов. (Полянец Н.И., 1997; Ивашкевич О.П., 2005).

По данным наших многолетних наблюдений по причине длительного бесплодия из-за депрессии яичников выбывают из дойного стада 8–10% животных, не давших приплода и молочной продукции на 20–25%.

Разработка и освоение производства лечебных препаратов (стимуляторов) с высокой терапевтической эффективностью, позволяющей решать проблему управления процессами размножения сельскохозяйственных животных, повышая их плодовитость и профилируя бесплодие, приобретает особую актуальность, являясь важнейшей экономической и социальной задачей для республики.

Для коррекции репродуктивной функции у коров с гипофункцией яичников широко используются гормональные препараты эстрогенного и гонадотропного действия. Однако их применение при длительной ацикличности

практически малоэффективно, не дает положительного результата, а иногда чревато серьезными последствиями, связанными с атрофией или образованием кист в яичниках (Нежданов А.Г., 1987 и др.), что приводит к значительным экономическим потерям из-за непроизводительного выбытия.

Разработка, производство и отработка оптимальных схем применения нового препарата позволит повысить результативность ветеринарных мероприятий по борьбе с бесплодием коров.

Целью работы является разработка комплексного экологически безопасного средства и схем лечения гипофункции яичников (анафродизии) у коров.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа проводилась в отделе патологии размножения и ветеринарной санитарии, виварии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» и базовых хозяйствах института УП АК «Ждановичи» Минского района и ГП «ЖодиноПлемЭлитаАгро» Смолевичского района Минской области.

Подбор исходных ингредиентов осуществлялся по принципу физической, химической и фармакологической совместимости компонентов и стабилизаторов для получения рабочего состава субстанций с учетом разовой терапевтической дозы. При подборе композиций препарата использовали субстанции, способные оказывать общестимулирующий и специфический эффект (сапонин, альвеозан, витамин Е, АСД-2 (антисептическая смесь Дорохова), ИСА-15 (иммуностимулирующий адъювант) и др.). При этом учитывали физическую и фармакологическую совместимость.

Для приготовления лабораторного образца препарата были подготовлены исходные компоненты. В соответствии с требованиями, предъявляемыми к фармакологическим препаратам, разработан лабораторный регламент, наработано 100 доз лабораторного образца препарата и дана его токсикологическая оценка согласно «Методическим указаниям по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии» (Мн., 2007 г.).

Изучение стимулирующего действия лабораторного образца препарата при гипофункции яичников проводили после предварительного установления оптимальной лечебной дозы. Для этого из длительно не приходящих в охоту коров сформировали 3 группы (по 5–6 гол.). Животным вводили препарат внутримышечно соответственно в дозах 5,0; 10,0 и 15,0 см³ трехкратно с интервалом 5–7 дней.

С учетом полученных результатов провели основной опыт в два этапа на 29 коровах. С этой целью по принципу аналогов было сформировано три группы длительно не приходящих в охоту (2–4 мес.) коров, у которых при ректальном исследовании диагностировали гипофункцию яичников.

На первом этапе животным 1 группы (7 гол.) инъектировали гонадостим внутримышечно в дозе 10 мл трехкратно с интервалом 10 дней, а коровам 2 группы (9 гол.) – с интервалом 5–7 дней.

На втором этапе животным 3 группы (13 гол.) применяли препарат по схеме с наибольшим терапевтическим эффектом. Эффективность терапии

испытуемого препарата определяли по срокам и степени проявления половых циклов.

Эффективность терапии испытуемого препарата определяли по срокам и степени проявления полноценных половых циклов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ходе проведенных нами предварительных исследований установлено, что наибольшая стимулирующая активность компонентов проявилась со стороны таких лекарственных средств, как АСД-2 фракция (33,3%), витамин Е-25% (37,5%) и эстрадиол (42,8%), что и определило их использование при конструировании субстанции комплексного препарата.

По результатам проведенного скрининга с учетом физической, химической и фармакологической совместимости компонентов были приготовлены две субстанции препарата: АСД-2 ф + витамин Е-25% (№1) и АСД-2 ф + витамин Е + эстрадиол (№2). Для придания более устойчивой формы в полученные субстанции был введен эмульгатор ИСА-15. Результаты испытаний показали, что при использовании субстанции №1 (13гол.) половое возбуждение проявилось у 6 (46,1%) коров, а от применения субстанции №2 (8гол.) – у 5 (62,5%) животных (таблица1).

Таблица 1 – Результаты сравнительной эффективности различных субстанций разрабатываемого препарата при гипофункции яичников у коров

Субстанция препарата	Количество обработанных коров	Пришло в охоту	
		голов	%
№1 АСД-2ф витамин Е	13	6	46,1
№2 АСД-2ф витамин Е25% эстрадиол	8	5	62,5

Полученные результаты позволяют заключить, что наиболее перспективными компонентами для конструирования комплексного препарата, оказывающими стимулирующее действие на воспроизводительную функцию коров являются антисептик-стимулятор Дорогова 2 фракция (АСД-2ф), витамин Е (25%) и эстрадиол (эстрогенный гормон) с использованием эмульгатора ИСА-15.

На основании ранее полученных данных приготовлен лабораторный образец препарата (согласно рецептуре субстанции №2) для дальнейших исследований, установлена его безвредность и дано название «Гонадостим». Проведенные испытания показали, что наиболее оптимальное применение комплексного препарата «Гонадостим» его внутримышечное введение в дозе 10 мл трехкратно с интервалом 5–7 дней (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты сравнительной эффективности различных схем применения испытуемого препарата «Гонадостим» при гипофункции яичников у коров

Схемы применения препарата	Количество обработанных коров	Пришло в охоту	
		голов	%
№1 трехкратно с интервалом 10 дней	7	2	28,5
№2 трехкратно с интервалом 5–7 дней	9	8	88,8

Для подтверждения полученного вывода проведено повторное клиническое испытание препарата в производственных условиях, результаты которого представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты клинических испытаний препарата «Гонадостим» при гипофункции яичников у коров

Показатели	Пришло в охоту			
количество обработанных животных, гол. %	всего	в том числе: после введения препарата		
		1-го	2-го	3-го
13	10	5	3	2
100,0	76,9	38,4	23,0	15,4
сроки проявления половых циклов, дни	8,9	2,4	14,0	17,5
затрачено препарата, доз	2,0	–	–	–

Как следует из приведенных данных, всего пришло в охоту после трехкратных обработок 10 (76,9%) коров, в том числе: 5 (38,4%) гол. – на 2–3 день после 1-ой инъекции препарата, 3 (23,0%) гол. – на 4–6 день после повторного введения и 2 (15,4%) гол. – на 3–7 день после третьей обработки. Сроки проявления половых циклов после стимуляции составили, в среднем, 8,9 дня с затратой двух доз препарата.

Побочного действия от применения препарата не зарегистрировано.

В последующем будут проведены сравнительные испытания препарата в производственных условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1 Наиболее оптимальной схемой применения комплексного препарата «Гонадостим» является его внутримышечное введение в дозе 10 мл трехкратно с интервалом 5–7 дней.

2 Терапевтическая эффективность препарата «Гонадостим» при гипофункции у коров составила (76,9%), в том числе: 38,4% – на 2–3 день после 1-ой инъекции препарата, 23,0% на 4–6 день после повторного введения и 15,4% – на 3–7 день после третьей обработки.

ЛИТЕРАТУРА

1 Грига, Э.Н. *Послеродовая патология коров (этиология, диагностика, терапия и профилактика)* : автореферат. дис. канд. вет. наук. – Ставрополь, 2003. – 49 с.

2 Ивашкевич, О.П. *Состояние воспроизводства и профилактика бесплодия коров в хозяйствах Беларуси Сельское хозяйство – проблемы и перспективы: сб. научн. тр. УО «ГГАУ»*. – Гродно: УО «ГГАУ», 2005. – Т. – Ч.3. – С.80–86.

3 Ивашкевич, О.П. *Диагностика стельности, профилактика и лечение при бесплодии у коров* / О.П. Ивашкевич // Минск, 2008. – 198 с.

4 *Методические указания по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии* (Минск, 2007).

5 Нежданов, А.Г. *Физиологические основы профилактики симптоматического бесплодия коров: автореф. дис. д-ра вет. наук. Воронеж, 1987. – 39 с.*

6 Полянцев, Н.И. *Об этиопатогенезе гипофункции яичников у коров* / Н.И. Полянцев // Сб. науч. тр. – Новочеркасск, 1997. – С. 135–138.

УДК 636.2:612.323/33

АКТИВНОСТЬ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ У КОРОВ РАЗНЫХ ВОЗРАСТОВ

С.Н. МОТУЗКО, Н.С. МОТУЗКО, А.М. СУББОТИН

*«УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия
ветеринарной медицины», г. Витебск, РБ*

Поступила в редакцию 24.06.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Нарушение состояния здоровья во многом связано с неустойчивой адаптацией или срывом адаптационных процессов и переходом к патологическим реакциям. Узловой вопрос физиологии адаптации животных к внешним факторам – сохранение и поддержание внутренней среды (гомеостаза), и специалисты сельского хозяйства должны помочь животным приспособиться в конкретной создаваемой среде к условиям промышленного животноводства.

Одним из важных вопросов в этом направлении является изучение пищевой адаптации животных к структуре рациона.

Сегодня мы имеем целый ряд кормовых рационов, которые могут обеспечить высокую продуктивность и плодовитость животных, а также антистрессорных препаратов, премиксов и медикаментов, которые профилактируют явления стресса и способствуют восполнению энергетических затрат.

Однако недооценка натурального сена и травы для крупного рогатого скота – одна из причин нарушения пищевой адаптации вследствие несоблюдения оптимального количества легко усвояемой клетчатки и биологически активных веществ в рационе. Выявлена прямая связь сахаропротеинового отношения, кислотно-щелочного равновесия, pH крови с высококонцентратным и силосноконцентратным типом кормления коров. В сочетании с гиподинамией такой тип кормления создает условия для предрасположения к кетозу и ожирению коров, поэтому необходимо пересмотреть традиционные нормы питания концентратами.

Таким образом, на изменение физико-химических свойств рационов и смену режимов кормления животные отвечают активной приспособительной реакцией. В пищеварительном тракте изменяется ферментативный фон (ферментные адаптации). Но реадаптация вполне возможна, если важнейшие пищеварительные ферменты придут в соответствие с вновь введенными ингредиентами корма. В этом отношении представляют интерес исследования по выяснению особенностей кормления на различных по структуре рационах.

Полагаем, что дальнейшая разработка проблемы обеспечения здоровья и высокой продуктивности животных должна быть направлена на изучение механизмов адаптации, без чего невозможно правильно представить физиологию функций. В этом отношении следует обратить внимание на изучение нейрогуморального статуса у высокопродуктивных животных и разработку физиологических, электрофизиологических, биохимических критериев нарушения процессов адаптации [1, 2, 3, 4].

Целью наших исследований явилось изучение активности щелочной фосфатазы в содержимом и слизистой желудочно-кишечного тракта у коров разных возрастов при интенсивных технологиях содержания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Опыт проводился в хозяйствах Глубокского района Витебской области. По принципу аналогов было подобрано 3 группы коров по 9 животных в каждой группе: 1-я – коровы после первого отела, 2-я – коровы после второго отела, 3-я – коровы после третьего отела. Для исследования бралось содержимое и слизистая желудка, 12-перстной кишки, тощей, подвздошной, слепой, ободочной и прямой кишок.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Полученные результаты свидетельствуют, что активность щелочной фосфатазы в содержимом желудка составила у коров после первого отела $801,56 \pm 28,3$ ЕД/л, у коров после второго отела – $963,84 \pm 34,7$ ЕД/л и у коров после третьего отела – $902,15 \pm 41,17$ ЕД/л. Активность щелочной фосфатазы в слизистой желудка была более выражена, чем в его содержимом. Так, уве-

личение у коров после первого отела составило 104,77 %, после второго отела – 37,34 % и третьего отела – 37,19 % ($p>0,001$) (рисунок 1).

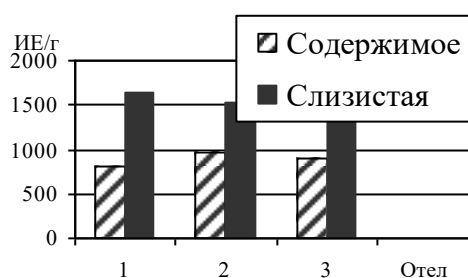


Рисунок 1 – Активность щелочной фосфатазы в желудке у коров разных возрастов

При поступлении содержимого из желудка в кишечник активность щелочной фосфатазы резко увеличилась. Так, в содержимом 12-перстной кишки у коров после первого отела активность щелочной фосфатазы уже составляла $2486,58 \pm 61,6$ ЕД/л, а после второго отела – $3167,29 \pm 78,6$ ЕД/л и после третьего отела – $2874,37 \pm 69,57$ ЕД/л. В слизистой 12-перстной кишки активность щелочной фосфатазы была достоверно выше ($p>0,01$) у коров после второго отела по отношению к другим возрастам животных, а также к активности щелочной фосфатазы к содержимому этой кишки (рисунок 2).

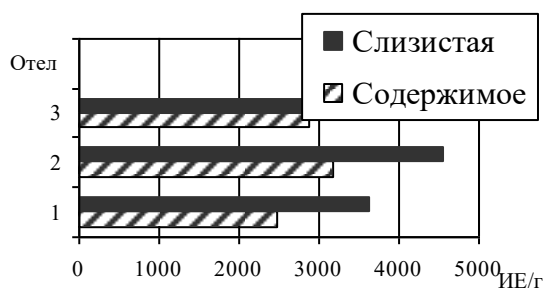


Рисунок 2 – Активность щелочной фосфатазы в 12-перстной кишке у коров разных возрастов

В тощей кишке выраженность щелочной фосфатазы резко снизилась. Так, в содержимом кишки она была у коров после первого отела – $947,16 \pm 38,7$ ЕД/л, что достоверно ниже, чем у коров после второго отела – $2223,28 \pm 62,3$ ЕД/л, и после третьего – $1923,34 \pm 40,09$ ЕД/л. Низкая активность щелочной фосфатазы отмечалась также в слизистой данной кишки. Так, у коров после первого отела она составила $1589,24 \pm 56,3$ ЕД/л, что на 115,03 % ниже, чем у коров после второго отела, и на 93,78 % ниже, чем у коров после третьего отела ($p < 0,01$).

С поступлением содержимого в подвздошную кишку активность щелочной фосфатазы снизилась, но самая высокая была у коров после второго отела (рисунок 3).

В толстом кишечнике ее активность нами не установлена.

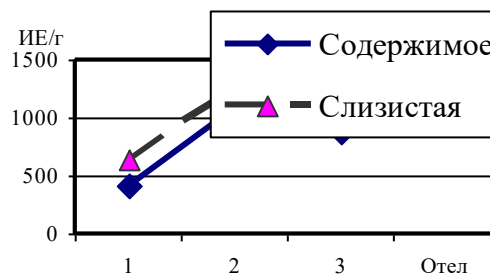


Рисунок 3 – Активность щелочной фосфатазы в подвздошной кишке у коров разных возрастов

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что активность щелочной фосфатазы была выше в слизистой тонкого кишечника и при этом превышала уровень ее в содержимом этой кишки. Нами установлены возрастные особенности содержания щелочной фосфатазы, которые были самыми высокими у коров после второго отела.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Интенсификация производства молока: опыт и проблемы: монография / В.И. Смунов [и др.]. – Витебск: ВГАВМ, 2012. – 486 с.
- 2 Совершенствование технологических процессов производства молока на комплексах: монография / Н.С. Мотузко [и др.]. – Минск: Техноперспектива, 2013. – 481 с.
- 3 Технологические и физиологические аспекты выращивания высокопродуктивных коров: монография / В.И. Смунов [и др.]. – Витебск: ВГАВМ, 2014. – 320 с.
- 4 Физиологические и технологические аспекты повышения молочной продуктивности: монография / Н.С. Мотузко [и др.]. – Витебск: ВГАВМ, 2009. – 486 с.

УДК 615.9:613

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ФАРМАКОДИНАМИКИ ГЕЛЯ ПРОТИВОМАСТИТНОГО

В.А. СТЕЛЬМАХ¹, М.П. КУЧИНСКИЙ², С.А. БЕРЕЗОВСКАЯ¹,
И.И. ИЛЬЮКОВА¹, Т.В. ДЕМЕНКОВА¹

¹ РУП «Научно-практический центр гигиены», г. Минск, РБ

² РУП «Институт экспериментальной ветеринарии
им. С.Н. Вышеслесского», г. Минск, РБ

Поступила в редакцию 01.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

В комплексе мер борьбы с маститом сельскохозяйственных животных основное значение придается применению специальных противовоспалительных средств, которые обладают антимикробным действием в отношении возбудителей заболеваний вымени. В настоящее время с участием ученых НИИ физико-химических проблем Белгосуниверситета и специалистов Минского завода ветеринарных препаратов создана оригинальная отечественная рецептура антимикробного полимер-лекарственного комплекса в виде геля, предназначенная для лечения мастита у коров.

Положительные медико-биологические качества геля-основы (нетоксична, не раздражает ткани, устойчива к воздействию света и температуры, обладает выраженными осмотическими свойствами) позволяют осуществить на ее основе создание принципиально новых лекарственных препаратов антимикробного, противовоспалительного и регенерационного действия.

В целях эффективного внедрения в практику антимикробного полимер-лекарственного комплекса проведено экспериментальное изучение некоторых особенностей его фармакодинамики. Результаты проведенных экспериментов отражены в настоящем сообщении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение противовоспалительного, антимикробного и ранозаживляющего действия геля антимаститного проведено на модели скарифицированной наочно-чрезкожной инфицированной патогенным стафилококком раны спины белых крыс.

На предварительно лишенной шерсти коже спины белых крыс формировали операционное поле площадью 4 см². Внутрикожно вводили суточную культуру условно-патогенного золотистого стафилококка (10¹⁰ клеток/мл) в объеме 0,1–0,15 мл (всего на моделируемой поверхности формировали 4–6 внутрикожных папул). На свободную от папул кожу спины в пределах операционного поля наносили скарификационные борозды, вскрывающие и глубокие слои кожи. Скарификационное поле дополнительно орошали культурой условно-патогенного золотистого стафилококка в объеме 0,1–0,05 мл.

Из подопытных животных (использовано 35 рамдобредных животных – самок, исходной массой 200–210 г.) сформировано пять равновеликих групп, которым через четыре часа после проведения инвазийных манипуляций проводили однократно мероприятия:

- первая – контроль (никаких лечебных мероприятий не проводили);
- вторая – обработка (нанесение на скарифицированную поверхность 1%-го геля в объеме 0,4 мл);
- третья – обработка (нанесение на скарифицированную поверхность композиции, состоящей из 1%-ной гелевой матрицы, 1%-ного диоксида и 1%-го линкомицина в том же объеме);
- четвертая – обработка (нанесение на скарифицированную поверхность композиции, состоящей из 1%-ной гелевой матрицы, 0,2%-го диоксида и 0,2%-го линкомицина в том же объеме);
- пятая – обработка (нанесение на скарифицированную поверхность композиции, состоящей из 1%-го диоксида и 1%-го линкомицина в виде раствора в дистиллированной воде в том же объеме).

Длительность эксперимента – 5 суток. В процессе опыта ежедневно проводили оценку ранозаживляющих и противовоспалительных эффектов, используя количественную оценку явлений воспаления (степень покраснения – в баллах и величина отека по изменению толщины кожной складки – ТКС) [1], а также выполняли бактериоскопию раневого содержимого в районе операционного поля [2, 3].

С раневой поверхности с соблюдением правил асептики стерильным ватным тампоном делали смыв в течение 10 секунд и помещали ватный тампон в пробирку с 2 мл стерильного физиологического раствора. Для выявления золотистого стафилококка высевали по 0,1 мл смывной жидкости на агар Байрд-Паркер, втирая посевной материал фламбированным шпателем. Чашки инкубировали при температуре 37⁰С. Посевы просматривали через 24 часа, окончательный учет результатов проводили через 48 часов.

Для обнаружения общего количества микроорганизмов 0,1 мл посевного материала высевали на питательный агар аналогичным способом. Чашки инкубировали при температуре 30⁰С в течение 24 часов. Учет результатов проводили через 24 часа.

Подсчет колоний осуществляли на двух параллельных чашках Петри, содержащих не более 300 колоний. Подсчитывали все видимые колонии.

Расчет концентрации микробных клеток X , КОЕ/мл производили по формуле (1):

$$X = N \cdot V \cdot 100, \text{ КОЕ/мл, где} \quad (1)$$

X – концентрация микробных клеток;

N – количество колоний, выросших на чашке;

V – объем смывной жидкости, высеваемой на чашку;

100 – коэффициент пересчета на 1 мл смывной жидкости.

За окончательный результат измерения принимали среднее арифметическое значение двух параллельных определений X_{cp} , которое производили по формуле (2):

$$X_{cp} = (X_1 + X_2)/2, \text{ КОЕ/мл, где} \quad (2)$$

X_1 – результат первого параллельного измерения;

X_2 – результат второго параллельного измерения.

Полученные в результате исследований экспериментальные данные обработаны общепринятыми методами вариационной статистики.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Микрофлора участков кожи подопытных животных в начале эксперимента (фон) была представлена, в основном, грам⁺ неспорообразующими бактериями. Была проведена идентификация микроорганизмов с использованием бактериологического анализатора Vitek 2 Compact. Были выявлены бактерии семейства *Micrococcaceae* – *Staphylococcus xylois*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus cohnii ureal*.

Количественное содержание микроорганизмов в смывной жидкости с исследуемого участка кожи составило $3,10 \lg \pm 0,03$ КОЕ/мл (1 группа – контрольная), $3,22 \lg \pm 0,11$ КОЕ/мл (2 группа – однократная обработка 1% гелем (ПААГ)), $3,25 \lg \pm 0,04$ КОЕ/мл (3 группа – однократная обработка составом: гель (ПААГ) 1% – линкомицин 0,2% – диоксидин 0,2%), $3,20 \lg \pm 0,03$ КОЕ/мл (4 группа – однократная обработка составом: гель (ПААГ) 1% – линкомицин 1% – диоксидин 1%), $3,12 \lg \pm 0,08$ КОЕ/мл (5 группа – однократная обработка составом: гель (ПААГ) 0% – линкомицин 1% – диоксидин 1%). Количество *Staphylococcus spp* (было определено на следующем уровне: $3,16 \lg \pm 0,15$ КОЕ/мл – 1 группа, $3,30 \lg \pm 0,09$ КОЕ/мл – 2 группа, $3,00 \lg \pm 0,11$ КОЕ/мл – 3 группа, $2,91 \lg \pm 0,06$ КОЕ/мл – 4 группа, $2,83 \lg \pm 0,10$ КОЕ/мл – 5 группа).

Через 4 часа после подкожного введения культуры *S. aureus* и моделирования кожно-чрезкожной раны спины проводили смыв с раневой поверхности операционного поля. Как видно из таблиц 1–5, во всех исследуемых группах наблюдался умеренный рост *S. aureus*, что может свидетельствовать об этиологической роли данного возбудителя в развитии гнойно-воспалительного процесса.

Через 24 часа после моделирования раны в 1 и 2 группах наблюдалось увеличение количества бактерий *Staphylococcus aureus* (далее – *S. aureus*) при одновременном снижении количества микроорганизмов *Staphylococcus spp.* (далее – *S. spp.*), что может свидетельствовать об антагонистических свойствах золотистого стафилококка по отношению к другим видам стафилококков. Снижение *S. spp.* в 1 группе статистически значимо, при $p \leq 0,05$ значение критерия Стьюдента $t^0=9,9$, во 2 группе – значение $t^0=12,4$. В группе 3 после однократной обработки составом, включающим 0,2% линкомицин и 0,2% диоксидин, отмечалось достоверное снижение как микроорганизмов *S. aureus* (при $p \leq 0,05$ значение $t^0=6,7$), так и *S. spp.* (при $p \leq 0,05$ значение $t^0=7,7$) вплоть до полной элиминации микроорганизмов из очага.

В группах 4 и 5 после однократной обработки составом, включающим 1,0% линкомицин и 1,0% диоксидин, также наблюдалась стойкая тенденция к снижению количества микроорганизмов семейства *Micrococaceae*. Статистически достоверное снижение микроорганизмов *S. aureus* (при

$p \leq 0,05$ значение $t^0=11$) и *S. spp.* (при $p \leq 0,05$ значение $t^0=7,9$) в 4 группе, снижение бактерий *S. aureus* (при $p \leq 0,05$ значение $t^0=15,3$) и *S. spp.* (при $p \leq 0,05$ значение $t^0=9$) в 5 группе.

Подавление микроорганизмов *S. spp.* условно-патогенным золотистым стафилококком отмечалось на протяжении последующих суток в 1 и 2 группах. Количественное содержание в смывной жидкости с исследуемого участка кожи *S. aureus* составило $3,67 \pm 0,10$ КОЕ/мл и $3,17 \pm 0,10$ КОЕ/мл соответственно через 2 и 5 суток в 1 группе и $3,26 \pm 0,13$ КОЕ/мл и $2,50 \pm 0,21$ КОЕ/мл соответственно через 2 и 5 суток во 2 группе. Количество микроорганизмов *S. spp.* в 1 группе на протяжении 2 и 5 суток составило 0 КОЕ/мл в смывах с раневой поверхности. Во 2 группе количество бактерий *S. spp.* было определено на уровне $0,24 \pm 0,42$ КОЕ/мл и $0,20 \pm 0,34$ КОЕ/мл соответственно через 2 и 5 суток.

В группе 3 в течение 2 и 5 суток после обработки составом, включающим 0,2% диоксидин и 0,2% линкомицин, вновь отмечался рост как *S. aureus*, так и *S. spp.*, что может свидетельствовать о бактериостатических свойствах данной композиции. Количество *S. aureus* в смывной жидкости с исследуемого участка кожи составило $2,09 \pm 0,29$ КОЕ/мл и $1,89 \pm 0,27$ КОЕ/мл соответственно через 2 и 5 суток. Снижение количества бактерий *S. spp.* на 5 сутки статистически значимо (при $p \leq 0,05$ значение $t=12,2$). Количество *S. spp.* было определено соответственно $2,92 \pm 0,07$ КОЕ/мл и $2,92 \pm 0,17$ КОЕ/мл через 2 и 5 суток. Снижение количества бактерий *S. spp.* статистически значимо (при $p \leq 0,05$ значение $t^0=2,7$).

В группах 4 и 5 после однократной обработки композициями с 1% линкомицином и 1% диоксидином в течение 2 и 5 суток эксперимента наблюдалось постепенное нарастание титра как *S. aureus*, так и *S. spp.*. В 4 группе количество *S. aureus* в смывной жидкости с поверхности раны составило $1,56 \pm 0,41$ КОЕ/мл и $2,23 \pm 0,56$ КОЕ/мл соответственно через 2 и 5 суток, количество *S. spp.* – $3,06 \pm 0,09$ КОЕ/мл и $2,77 \pm 0,16$ КОЕ/мл. Тем не менее, снижение количества *S. aureus* в конце эксперимента было статистически значимо (при $p \leq 0,05$ значение $t^0=5,2$) в отличие от снижения количества бактерий *S. spp.* (при $p \leq 0,05$ значение $t^0=2$ при $t_{кр}=2,45$). В 5 группе количество *S. aureus* в смывной жидкости с исследуемого участка операционного поля было определено на уровне $1,85 \pm 0,11$ КОЕ/мл и $2,09 \pm 0,24$ КОЕ/мл соответственно через 2 и 5 суток, количество *S. spp.* – $3,10 \pm 0,05$ КОЕ/мл и $2,95 \pm 0,06$ КОЕ/мл. Снижение количества *S. aureus* в ходе исследования было статистически значимо (при $p \leq 0,05$ значение $t^0=4,1$), снижение количества бактерий *S. spp.* к концу эксперимента статистически значимо (при $p \leq 0,05$ значение $t^0=3,1$).

Таким образом, гель противомаститный резко снижает антагонистическую активность *S. aureus*, агрессивно выраженную при его межмикробных взаимодействиях [5].

В процессе изучения противовоспалительных свойств геля антимаститного установлено, что динамика изменения интенсивности эритемы (рисунок 1) и динамика прироста толщины кожной складки (рисунок 2) при моделировании инфекционной скарифицированной кожно-чрезкожной раны спины и ее лечении различными комбинациями рецептур препарата однозначно указывают на то, что однократное нанесение геля состава поли-

мерная матрица – 1,0%, диоксидин – 1,0% и линкомицин – 1,0% оказывает выраженное противовоспалительное, антимикробное и ранозаживляющее действие.

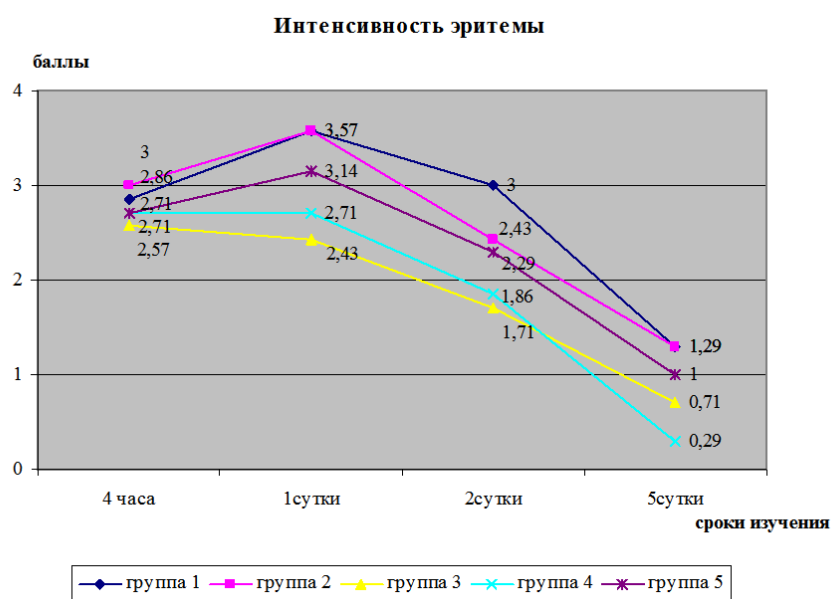


Рисунок 1 – Динамика изменения интенсивности эритемы при моделировании инфекционной скарифицированной кожно-чрезкожной раны спины и ее лечении различными комбинациями рецептур антимаститного геля

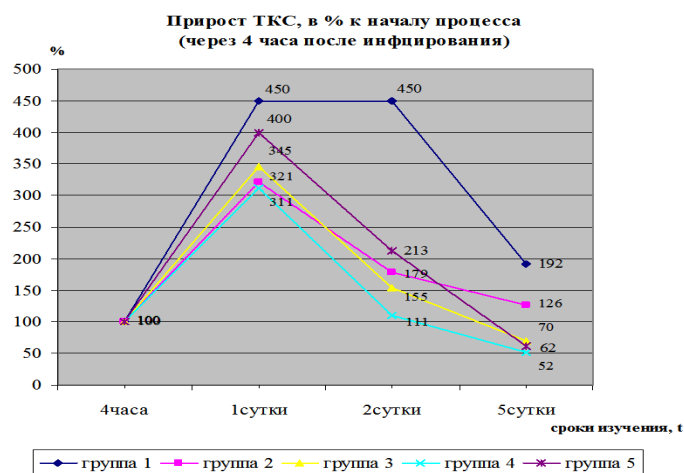


Рисунок 2 – Динамика прироста толщины кожной складки (ТКС) при моделировании инфекционной скарифицированной кожно-чрезкожной раны спины и ее лечении различными комбинациями рецептур антимаститного геля

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что на модели скарифицированной наочно-чрезкожной инфицированной условно-патогенным золотистым стафилококком раны спины белых крыс исследованы две композиции антимаститного геля в сравнении с раствором матрицы и водным раствором антибиотика и антисептика. Выявлено, что однократное нанесение геля состава полимерная матрица – 1,0%, диоксидин – 1,0% и линкомицин – 1,0% оказывает выраженное противовоспалительное, антимикробное и ранозаживляющее действие. Таким образом, препарат может быть рекомендован для применения в ветеринарии в качестве эффективного средства для лечения маститов у сельскохозяйственных животных.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ // Инструкция 1.1.11–12–35–2004. /Минздрав РБ, 2004. – 42с.
- 2 Покровский, В.И. Медицинская микробиология / Гл. ред В.И. Покровский, О.К. Поздеев. – М., ГЭОТАР Медицина, 1999. – 1200 с.
- 3 Методы общей бактериологии. Пер. с англ. / Под ред. Ф. Герхардта [и др.]. – М.: Мир, 1983. – 536с.
- 4 Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под. ред. М.О. Биргера – 3-е изд., перераб. И доп. – М.: Медицина, 1982. – 464с.
- 5 Семенов, А.В. Характеристика антагонистической активности *Staphylococcus aureus* при межмикробных взаимодействиях / А.В. Семенов // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2011. – № 3 (15). – С. 56–66.

УДК 615.9.613

РАЗРАБОТКА ВЕТЕРИНАРНОГО ПРОТИВОМАСТИТНОГО ПРЕПАРАТА «ДИОКСИЛИН-ГЕЛЬ»

В. О. МИРОНЧИК¹, В.А. СТЕЛЬМАХ², Н.К. ЮРКШТОВИЧ¹,
Ф.Н. КАПУЦКИЙ¹, В.А. АЛИНОВСКАЯ¹, Т.А. НИТИЕВСКАЯ³

¹ Учреждение БГУ «Научно-исследовательский институт
физико-химических проблем», г. Минск, РБ

² РУП «Научно-практический центр гигиены», г. Минск, РБ

³ УП «Минский завод ветеринарных препаратов», г. Минск, РБ

Поступила в редакцию 06.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Среди различных терапевтического характера заболеваний у коров – самое распространенное и самое опасное – маститы (воспаление вымени). Отечественной наукой и практикой достигнуты определенные успехи в решении проблемы мастита у животных. Вместе с тем, несмотря на имеющиеся достижения, проблема мастита продолжает оставаться одной из актуальных для ветеринарии. Длительное и повсеместное применение химиотерапевтических средств нередко приводит к снижению эффективности лечения данного заболевания из-за образования лекарственно устойчивых штаммов микроорганизмов.

Создание нового поколения отечественных высокоэффективных препаратов в виде гелей является актуальной задачей для отечественной ветеринарии, что повысит эффективность лечебных мероприятий при маститах у коров на основе комплексной терапии новыми препаратами патогенетического, симптоматического и этиотропного действия. Положительные качества геля-основы позволяют осуществить создание принципиально новых лекарственных препаратов антимикробного, противовоспалительного и регенерационного действия путем введения в гелевую основу необходимых препаратов.

С целью создания препарата, предназначенного для лечения и профилактики маститов у коров, разработана рецептура, содержащая в своем составе антибиотик (линкомицина гидрохлорид) и антисептическое средство (диоксидин) на основе гидрогелевой матрицы,

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для изучения физико-химических показателей были использованы методы спектрофотометрии, вискозиметрии, гравиметрии, прямой потенциометрии [1] полученного состава, а так же изучена его стабильность при хранении. Цель проведения испытаний стабильности – это получение данных об изменении качества действующего вещества или лекарственного препарата с течением времени под влиянием различных факторов окружающей среды, таких как температура, влажность и свет, а также установление рекомендуемых условий хранения и периода до проведения повторных испыта-

ний для действующего вещества или срока хранения для лекарственного препарата.

План изучения стабильности опытных образцов «Диоксилин-гель» предусматривал проведение долгосрочных испытаний стабильности препарата, при которых условия экспериментального хранения соответствовали требованиям раздела «Хранение», указанного в Государственной фармакопеи Республики Беларусь. Образцы субстанции, отобранные из ряда серий, были заложены на хранение при различных внешних параметрах. В таблице 1 приведены основные характеристики режимов экспериментального хранения образцов ветеринарного препарата «Диоксилин-гель».

Таблица 1 – Основные характеристики режимов экспериментального хранения образцов ветеринарного препарата «Диоксилин-гель»

№ п/п	Режим экспериментального хранения образцов	Температура	Относит. влажность	Общая продолжительность хранения	Периодичность проведения контрольных испытаний
1	2	3	4	5	6
1	долгосрочное хранение	$(25 \pm 2)^\circ\text{C}$	$(60 \pm 5) \%$	2 года	1 год хранения – через каждые 3 месяца; 2 год – через каждые 6 месяцев

При определении возможности использования полимера в качестве пролонгатора действия лекарственных веществ была проведена оценка его диффузионных характеристик. В качестве параметра, характеризующего диффузионные свойства растворов, содержащих полимер, использовали эффективный коэффициент диффузии ($D_{\text{эф}}$), характеризующий проницаемость полимеров или их растворов.

Для расчета эффективного коэффициента диффузии ($D_{\text{эф}}$) использовали уравнение:

$$F = 1 - \frac{8}{\pi} \exp\left(-\frac{\pi^2 D_{\text{эф}} t}{l^2}\right), \text{ где} \quad (1)$$

$$F = \frac{\bar{C}_t}{C_\infty}$$

– степень завершенности процесса;

$\overline{C}_t$, $\overline{C}_\infty$ – концентрации активного компонента в физиологическом растворе в момент времени t и при равновесии с раствором соответственно;

l – толщина слоя, см.

Для обработки экспериментальных данных используется уравнение (1) в логарифмической форме:

$$\ln(1-F) = \ln \frac{8}{\pi} - \frac{\pi^2 D_{эф} t}{l^2} \quad (2)$$

значение $D_{эф}$ вычисляли по тангенсу угла наклона кривой зависимости $\ln(1-F)$ от t по уравнению:

$$D_{эф} = \frac{l^2}{\pi^2} \operatorname{tg} \alpha \quad (3)$$

Наряду с исследованием физико-химических характеристик созданной рецептуры исследован ряд ее медико-биологических свойств согласно методическим приемам, изложенным в «Методических указаниях по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии»[2].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе проведенных исследований была изучена кинетика релиза (вымывания) действующих компонентов (диоксилина и линкомицина гидрохлорида) из растворов полиакриловой кислоты в зависимости от молекулярной массы и концентрации полимера в растворе в физиологический раствор (рисунок 1).

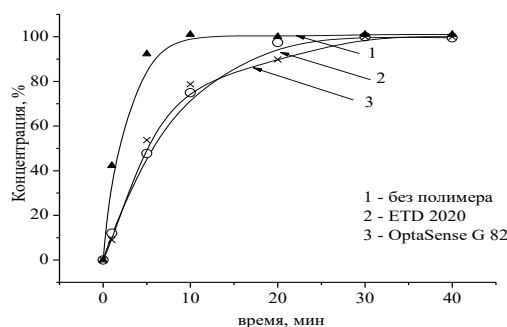


Рисунок 1 – Кинетические кривые релиза диоксилина из 1-водного раствора, 2- ПАК марки ETD 2020, 3- ПАК марки OptaSense G 82

На рисунке 2 приведены кинетические кривые релиза диоксилина из различных растворов в координатах $\ln(1-F)-t$.

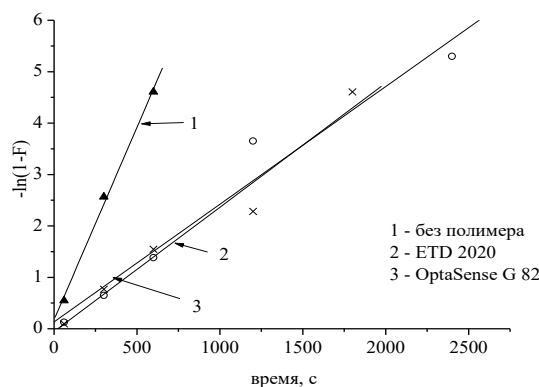


Рисунок 2 – Кинетические кривые релиза диоксилина из 1-водного раствора, 2- ПАК марки ETD 2020, 3- ПАК марки OptaSense G 82 в координатах $-\ln(1-F) - t$

Видно, что начальные участки всех кривых на рисунке 1 линейны, что является надежным признаком внутридиффузионного типа кинетики сорбции. Т.е. лимитирующей стадией переноса сорбата из фазы раствора полимера в раствор будет диффузия в полимере, и определяющим фактором будут свойства полимера, что и подтверждается рассчитанными $D_{эф}$ (таблице 2).

Таблица 2 – Зависимость эффективных коэффициентов диффузии растворов диоксилина в физиологический раствор от состава смеси

Состав смеси	$D_{эф}$, см ² /сек
Без полимера	$7,6 \times 10^{-4}$
ПАК ETD 2020	$2,3 \times 10^{-4}$
ПАК OptaSense G 82	$2,4 \times 10^{-4}$

Следует отметить, что аналогичная картина наблюдается на кинетических кривых релиза линкомицина гидрохлорида.

Изучены все качественные и количественные показатели, подтверждающие качество и сохранность препарата при хранении в темноте при комнатной температуре в течение проверенного срока – 12 месяцев.

Таким образом, создан препарат, предназначенный для лечения и профилактики маститов у коров, т.е. разработана оптимальная с химико-фармацевтических позиций рецептура, содержащая в своем составе антибиотик (линкомицина гидрохлорид) и антисептическое средство (диоксидин) на основе гидрогелевой матрицы.

Согласно результатам изучения острой внутрижелудочной, подкожной и внутрибрюшинной токсичности исследуемая рецептура геля ветеринарного классифицируется как мало токсичное химическое соединение (4

класс токсичности). Коэффициент видовой чувствительности (мыши/крысы) геля ветеринарного при внутрибрюшинном пути введения составляет 1,0, что свидетельствует об отсутствии видовых различий в резистентности животных на смертельном уровне. Подкожно-внутрибрюшинный коэффициент геля ветеринарного для крыс превышает 2,08, для мышей составляет 2,59. Дана оценка особенностям комбинированного токсического действия диоксилина и линкомицина в растворе ПАК (полимерной матрицы) и в водном растворе. Установлено, что острая интраперитонеальная токсичность композиций существенно не изменяется при использовании в качестве растворителя воды или раствор полимерной матрицы.

В результате исследований на крысах и кроликах установлено, что длительное внутрижелудочное и эпикутанное апплицирование препарата в максимально возможных количествах не приводит к появлению выраженных симптомов интоксикации, гибель животных в ходе эксперимента не наблюдалась, что свидетельствует об отсутствии у геля антимаститного способности к функциональной кумуляции на уровне проявления смертельных эффектов в условиях его трансдермального воздействия.

Кожно-раздражающие эффекты геля в процессе его длительного эпикутанного воздействия на неповрежденные кожные покровы крыс и кроликов не выявлены.

Таким образом, на основании результатов медико-биологических исследований оптимизирована рецептура ветеринарного препарата «Диоксилин-гель» по содержанию в ней линкомицина и диоксилина, а также полимерной основы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная рецептура ветеринарного препарата «Диоксилин-гель» для лечения мастита у коров обладает высокой терапевтической эффективностью, обусловленной использованием линкомицина гидрохлорида как антибиотика широкого спектра действия и диоксилина, эффективного при инфекциях, трудно поддающихся лечению другими антимикробными средствами, в виде полимерного геля, не действующим раздражающе на ткани молочной железы и, более того, обладающим пролонгированным эффектом.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Государственная фармакопея Республики Беларусь II, т. 1–3 // Минск. – 2009.
- 2 Методические указания по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии // Минсельхозпрод РБ. – 2007. – № 10–1–5. – 155 с.

Раздел 5. САНИТАРИЯ

УДК:614.48:619:631.115(476)

СПОСОБЫ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ДЕЗИНФЕКЦИИ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В УСЛОВИЯХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ. ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАЧЕСТВА АЭРОЗОЛЬНОЙ ДЕЗИНФЕКЦИИ

А.В. ЛЕВШЕНЮК, Н.А. КУЗНЕЦОВ

УО «Гродненский государственный аграрный университет», г. Гродно, РБ

Поступила в редакцию 31.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Бактериологический контроль качества дезинфекции животноводческих и птицеводческих помещений является неотъемлемым этапом ветеринарно-санитарных работ, следующим за подготовительным и собственно проведением дезинфекционных мероприятий.

Все бактериологические методы контроля качества дезинфекции, применяемые в условиях Республики Беларусь, подразделяются на методы исследования смывов и методы бактериологического исследования воздуха помещений при проведении объемной аэрозольной дезинфекции. Последние включают седиментационный и аспирационный методы [4,7].

При этом бактериологическая оценка при проведении дезинфекции в присутствии животных или в пустом помещении существенно отличается ввиду необходимости учета микрофлоры животных, микрофлоры обслуживающего персонала, кормов, воды, что и образует микробный состав воздуха производственного помещения[3].

При физическом способе дезинфекции, как и при влажной химической дезинфекции, целесообразно использовать метод исследования смывов. Химическая объемная аэрозольная и газовая дезинфекция предусматривают бактериологическую оценку методами седиментации или аспирации [1,2,6].

Поэтому актуальным является на основании доступных источников литературы изучить основные способы бактериологической оценки качества дезинфекции, применяемые в условиях Республики Беларусь, выделить базовые и дополнительные методы, провести сравнительный анализ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Учебные пособия; публикации в научно-практических журналах, сборниках конференций; авторефераты, диссертации.

Составление библиографии, реферирование, конспектирование, цитирование, аннотирование; теоретический анализ; индуктивный и дедуктивный методы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На основании аналитических данных составлена таблица по сравнительному анализу бактериологических методов оценки качества дезинфекции (таблица 1).

Таблица 1 – Сравнительная характеристика бактериологических методов оценки качества дезинфекции

Бактериологические методы оценки качества дезинфекции				
Критерий оценки	смывов	седиментационный	аспирационный	тест на АТФ в смывах
Оценка				
бактерии	+	+	+	–
грибы	+	+	+	–
вирусы	–	–	+	–
споры	+	+	+	–
АТФ	–	–	–	+
Среда				
твердая	+	–	–	+
жидкая	+	–	–	+
газообразная	–	+	+	–
Поверхности				
пол	+	–	–	+
стены	+	–	–	+
потолок	+	–	–	+
кормушки	+	–	–	+
ограждения	+	–	–	+
решетки	+	–	–	+
навозные каналы (ванны)	+	–	–	+

Базовым методом бактериологического контроля качества дезинфекции является метод исследования смывов. Сущность данного метода заключается в том, что предварительно готовят 10–20 стерильных стеклянных пробирок со стерильными аппликаторами и ватными тампонами, заполняя пробирки стерильной водой или стерильным физиологическим раствором в количестве 10 мл.

Пробы-смывы отбирают стерильными ватно-марлевыми тампонами с участков площадью 10×10 см, в отдельности отмывают в той же пробирке. Жидкость центрифугируют 20–30 минут при 3000–3500 об./мин., сливая надосадочную жидкость и доливая в пробирку такое же количество стерильной воды, и далее центрифугируют. Из центрифугата делают посе́вы.

Для индикации кишечной палочки используются среды Хейфеца или КОДА. Контроль наличия роста кишечной палочки проводится по изменению цвета среды в желтый с помутнением и образованием газа. Подтвер-

ждающий пересев производится на питательную среду Эндо.

Для индикации стафилококков центрифугат высевают в 5 мл мясопептонного бульона с 6,5%-ным хлористым натрием и по истечении сроков инкубации делают пересев на 8,5%-ный солевой мясопептонный агар. Для подтверждения роста стафилококков готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют.

Для выявления в пробах-смывах спорообразующих аэробов смывы путем отмытия, погружения и отжатия обрабатывают, но перед центрифугированием прогревают 30 минут на водяной бане при температуре 65°C и далее центрифугируют. Из центрифугата каждой пробы делают посевы в одну пробирку с мясопептонным бульоном (МПБ) и на две чашки с мясопептонным агаром (МПА) [4].

Метод исследования смывов позволяет определить только локальное санитарно-гигиеническое состояние обрабатываемых объектов: поилки, кормушки, участка стены.

Отбор проб-смывов осуществляется субъективно, при этом существует возможность выбора наиболее чистых участков, так как отсутствуют нормативные показатели, определяющие основные точки отбора проб.

Данный метод не позволяет оценить длительность и эффективность действия дезинфицирующих средств в динамике, а также в соответствии с этим выявить изменение микробного состава воздуха.

Также, используя данный метод, невозможно выявить наличие и определить концентрацию спор грибов, что необходимо ввиду возникновения массовых кандидозов и снижения иммунобиологической резистентности животных.

В целом метод исследования смывов прост и доступен, используется для бактериологической оценки дезинфекции закрытых и открытых помещений, что и определяет его широкое применение.

В настоящее время одним из дополнительных методов бактериологического контроля качества дезинфекции является экспресс-тест на определение АТФ в смывах.

Тест представляет собой одноразовое устройство с тампоном для взятия образца с поверхности. Тампон предварительно смочен катионным веществом, которое помогает забирать почву и высвобождать аденозинтрифосфат из целых клеток. При активации теста реагент в кювете устройства теста взаимодействует с АТФ, выделяя свет. Яркость света пропорциональна количеству АТФ и степени загрязнения.

Сложность использования данного метода заключается в том, что АТФ обнаруживается на коже, волосах и многих поверхностях, поэтому нельзя трогать тампон или тестируемую поверхность. Также тест не будет обнаруживать остатки продуктов с низким или нулевым содержанием АТФ. Результат исследования зависит от срока годности тест-систем, от метода забора проб, от обработки проб во время исследования, от используемого оборудования.

При оценке объемной аэрозольной дезинфекции дополнительными методами бактериологического контроля качества дезинфекции являются седиментационный и аспирационный методы.

Седиментационный метод по Р. Коху основан на осаждении микроорганизмов на поверхность питательной среды в открытые чашки Петри под действием силы тяжести и скорости движения воздуха [3, 7].

Данный метод применим для бактериологической оценки воздушной среды закрытых помещений как в присутствии, так и в отсутствии животных и птицы. Также разработаны основные уровни отбора проб воздуха.

Метод седиментации позволяет рассмотреть динамику изменения микробного состава воздуха помещения, а также оценить эффективность выбранных дезинфицирующих средств в производственных условиях.

Данный метод достаточно прост в выполнении, однако необходима бактериологическая база, наличие спектра питательных сред. Также важно соблюдение всех этапов седиментационного метода: от отбора проб воздуха до оценки результатов.

В области ветеринарной медицины количество используемых питательных сред может быть расширено до выявления санитарно-показательных микроорганизмов: бактерий группы кишечной палочки, стафилококков, спор грибов, а также сальмонелл в помещениях для содержания птицы.

Однако пока существует нормативный показатель только для общей микробной обсемененности воздуха. При этом для воздуха птицеводческих помещений возможно определение коли-индекса воздуха [5].

Результаты бактериологической оценки качества дезинфекции седиментационным методом напрямую зависят от зоогигиенических параметров помещения, учитывая это, можно провести комплексную санитарно-гигиеническую оценку помещения.

Аспирационный метод предусматривает использование приборов для аспирации воздуха: аппарат Кротова, бактериоуловитель Речменского, ПОВ-1, ПАБ-1, БВЭП-1, приборы Андерсена, Дьяконова и др.

Суть метода заключается в принудительном заборе воздуха непосредственно на чашки Петри с питательной средой или в приемники при последующем переносе на питательные среды. При этом действуют различные механизмы осаждения микробных клеток на поверхность среды [7].

Метод аспирации – трудоемкий и ресурсоемкий, так как кроме бактериологической основы подготовки чашек Петри и питательной среды – требует наличия соответствующей приборной базы, а также умений и навыка пользования приборами и правильного подсчета колоний микроорганизмов и расчета микробного числа воздуха.

Кроме этого, при наличии определенных точек отбора проб важно методологически правильно осуществлять забор воздуха, выдерживая время и режимы. Данный метод для оценки качества дезинфекции применим при исследовании воздуха закрытых помещений.

Также метод позволяет судить только о микробной обсемененности воздушной среды помещения, не давая оценку локальному санитарно-гигиеническому состоянию обрабатываемых объектов.

Аспирационный метод может быть расширен использованием большего количества питательных сред. Однако тогда возникают вопросы выбора режимов отбора проб воздуха, увеличивается время отбора, а также даль-

нейшая интерпретация полученных данных, что обусловлено отсутствием в настоящее время нормативных показателей по предельно допустимому содержанию колониеобразующих единиц стафилококков, бактерий группы кишечной палочки и спор грибов в воздухе животноводческих и птицеводческих помещений. Вместе с тем он считается более точным, чем метод седиментации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам исследования установлено, что базовые и дополнительные бактериологические методы контроля позволяют рассмотреть санитарно-гигиеническое состояние обрабатываемых объектов с разных сторон.

Поэтому для объективной оценки качества дезинфекции необходим комплексный бактериологический анализ, предполагающий сочетание применения различных методов оценки.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Горжковская, С.И. Дезинфекция в условиях ветеринарной практики/ С. И. Горжковская. – М.: « Высшая Школа», 1963. – 219с.
- 2 Зоогигиена и ветеринарная санитария в промышленном животноводстве/ Под ред. Г.К. Волкова – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 1982. – 414 с.
- 3 Медведский, В.А. Гигиена животных: учебник для студентов специальности «Ветеринарная медицина» с.-х. вузов/ В.А. Медведский [и др.]; под ред. В.А. Медведского. – Минск: Техноперспектива, 2009. – 617с.
- 4 Методические указания по контролю качества дезинфекции и санитарной обработки объектов, подлежащих ветеринарно-санитарному надзору/ РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»; сост.: А.Э. Высоцкий [и др.]. – Минск: РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», 2007. – 32с.
- 5 Методические рекомендации по санитарно-гигиенической оценке птицеводческого предприятия / РНИУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского Национальной академии наук Беларуси», УО «Витебская ордена «Знак почета» государственная академия ветеринарной медицины», РО «Белптицепром»; сост.: Б.Я. Бирман [и др.]. – Минск, 2006. – 18с.
- 6 Поляков, А.А. Руководство по ветеринарной санитарии / А.А. Поляков [и др.]. – М.: Агропромиздат, 1986. – 320с.
- 7 Юхневич, Г.Г. Микроорганизмы в биоиндикации и биотестировании: лаб. практикум / Г.Г. Юхневич, И.М. Колесник. – Гродно: ГрГУ, 2012. – 51с.

УДК 619:615:616.992.28:612.1:636.4

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ
ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ МИКОТОКСИКОЗОВ
ЖИВОТНЫХ «БИТОКС» НА КЛЕТКИ КРОВИ СВИНЕЙ**

П.А. КРАСОЧКО¹, В.Н. ДУБИНИЧ², М.В. ДУБИНИЧ²

¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии м. С.Н. Вышелецкого»,
г. Минск, РБ

²УО «Гродненский государственный аграрный университет», г. Гродно, РБ

Поступила в редакцию 07.08.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Широкая распространённость микотоксинов в кормах приводит к снижению естественной резистентности и реактивности организма, повышению восприимчивости животных к действию отрицательных факторов окружающей среды, что неизбежно ведёт к снижению продуктивности, ухудшению качества животноводческой продукции.

Выделение микотоксинов микромицетами возможно на всех уровнях производства кормов: в поле, при транспортировке и хранении зернофуража вследствие наличия спор в окружающей среде и распространяющихся пассивно с ветром, дождём, также возможен перенос спор микроскопических грибов насекомыми [1].

Условно продуценты микотоксинов разделяют на две группы: паразитирующие, отличающиеся способностью повреждать кормовые культуры в период вегетации растений, и сапрофитные или амбарные, растущие в условиях низкой влажности [2]. Причинами, способствующими возникновению в кормах амбарных микромицетов, является несоблюдение температурного и влажностного режима хранения как грубых, так и концентрированных кормов, некачественная подготовка зернохранилищ к приёму нового урожая. Значительно облегчает контаминацию зерна плесневыми грибами его повреждение амбарными вредителями, так как происходит разрушение оболочек зерна, что приводит не только к свободному проникновению спор в эндосперм, но и происходит постоянное увеличение влажности зерна. [3]. В таких условиях рост плесневых грибов наиболее интенсивен в результате наличия не только соответствующих параметров микроклимата, но и значительного количества питательных веществ, содержащихся в эндосперме зерна. Результатом, кроме контаминации фуража микотоксинами, является снижение питательной ценности зерна до 50–60% [1]. Более того, микотоксины, являясь низкомолекулярными соединениями, крайне устойчивы к высоким температурам, сушке, длительному хранению, химической обработке, и поэтому внешний вид корма не всегда может служить критерием его безопасности.

Чаще всего в различных кормах, особенно в готовом комбикорме встречаются комбинации различных микотоксинов, что вызвано способно-

стью одного вида плесени продуцировать несколько вторичных метаболитов с различной химической структурой. Отмечается также и синергетическое взаимодействие микотоксинов, на что указывают такие исследователи, как Тренхольм, Фрейнд, Перси: DON усиливает своё действие в присутствии ZON, T-2 токсин синергетически воздействует с DON, значительно снижая привесы, афлатоксин, взаимодействуя с T-2 токсином, значительно увеличивает смертность животных.

Микотоксины могут накапливаться в организме, поступая из кормов, содержащих их в количествах ниже определяемого уровня, что приводит к появлению хронического течения микотоксикозов, приводящих к снижению привесов, уменьшению конверсии корма, возникновению сопутствующих заболеваний различной этиологии. Клинические симптомы данного вида отравлений сходны с заболеваниями вирусной, паразитарной и бактериальной природы, что значительно затрудняет постановку диагноза в полевых условиях. Также ряд микотоксинов обладает тератогенным и канцерогенным действиями, а некоторые ослабляют иммунную систему организма, снижая его резистентность и реактивность [4, 5].

Экономический ущерб микотоксикозов в США составляет ежегодно 20 миллиардов долларов, в России – от 500 миллионов до 1,5 млрд. рублей, по данным ООН ежегодно поражается в мире в той или иной степени 25% кормов.

Учитывая всё перечисленное, оптимальным вариантом лечения и профилактики микотоксикозов является применение адсорбентов, вводимых в комбикорма, что позволит не только предотвратить последствия воздействия микотоксинов, но и нормализует защитные силы организма за счёт биологически активных веществ, входящих в состав препаратов. Комплексный препарат на основе хитозана, трепела и пробиотиков связывает полярные токсины и свободные радикалы в свободные комплексы, предупреждая их всасывание из желудочно-кишечного тракта.

Биологические свойства препаратов обусловлены активными компонентами составляющих. Хитозан, попадая в кислую среду желудочно-кишечного тракта, значительно увеличивает свою активность, что приводит к активации его адсорбционных свойств. Проявляя свойства полиэлектролита, хитозан приводит к образованию гелеподобной массы, препятствующей агрессивному воздействию микотоксинов на слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта. Также, обладая широким набором функциональных групп, хитозан связывает микотоксины, относящиеся к различным химическим группам, что крайне важно при использовании собственного зерна для производства комбикормов. Трепел является природным сорбентом, промышленное производство которого налажено в Республике Беларусь и защищает эпителий и микроструктуры желудочно-кишечного тракта от воздействия токсинов. Пробиотическая часть состоит из лиофильно высушенных лактобактерий, которые регулируют баланс микрофлоры.

Целью исследований являлось изучение влияния комплексного препарата на основе хитозана, трепела и пробиотиков на клетки крови поросят-отъёмышей в условиях хозяйств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в условиях кафедры микробиологии и эпизоотологии и научно-исследовательской лаборатории УО «Гродненский государственный аграрный университет», свиногомплексе «Желудокский» Щучинского района Гродненской области. Опыт был проведен на поросятах-отъемышах 30–35 дневного возраста в течение 30 дней. Для этого были сформированы шесть групп животных по принципу пар-аналогов по 25 поросят-отъемышей в каждой группе. Контрольная группа поросят получала основной рацион, принятый в хозяйстве согласно применяемым технологиям. Опытные группы №1–4 в дополнение к основному рациону получали комплексный препарат «Биотокс» в дозе 0,5, 1,0, 1,5 и 2,0 кг на тонну комбикорма. Опытной группе №5 в рацион вводили «Микофикс» в дозе 1,5 кг на тонну комбикорма.

Отбор проб крови проводили дважды: в начале и конце опыта. Кровь отбирали стерильными иглами из орбитального венозного синуса и краниальной поллой вены с соблюдением правил асептики и антисептики. В стабилизированной крови определяли количество эритроцитов, лейкоцитов, гемоглобина, гематокрита с помощью прибора «MEDONIC CA–620», Швеция.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При исследовании показателей гематологического профиля вначале исследования было установлено, что все показатели находятся в пределах физиологической нормы. Данный факт свидетельствует о нормально протекающих обменных процессах у животных как контрольной, так и опытных групп. В процессе проведения производственных испытаний в контрольной и некоторых опытных группах были животные с патологией кишечника, которым назначалось лечение при гастроэнтерите, принятое в хозяйстве.

В таблице 1 приведены результаты изучения гематологических показателей крови поросят после скармливания препарата «Биотокс».

Как видно из таблицы, количество эритроцитов до проведения эксперимента наибольшим было у животных контрольной группы – $7,3 \times 10^{12}/л$, данное значение максимально выше на 8,63% относительно первой опытной группы. Минимальное превышение наблюдалось относительно второй опытной группы и составляло 4,93%.

По окончании эксперимента ситуация значительно изменилась, максимальное количество эритроцитов наблюдалось во второй опытной группе и составляло $7,23 \times 10^{12}/л$. Данное значение было выше относительно животных контроля на 18,69 %.

Таблица 1 – Гематологические показатели крови поросят после скармливания препарат «Биотокс»

Показатели	Ед. изм.	Норма	Группы животных					
			кон- трольная	опытная № 1	опытная № 2	опытная № 3	опытная № 4	опытная № 5
до проведения эксперимента								
эритроциты	x10 ¹²	6–7.5	7.30± 0.23	6.67± 0.22	6.85± 0.24	6.94± 0.18	6.78± 0.27	6.89± 0.19
лейкоциты	x10 ⁹	8–16	12.70± 0.36	12.17± 0.41	13.83± 0.42	14.63± 0.65	14.22± 0.27	14.87± 0.93
гемоглобин	г/л	90–110	102.37± 1.00	101.53± 1.16	98.73± 1.45	98.12± 1.28	99.42± 1.26	102.78± 1.35
гематокрит	%	42	39.20± 0.96	37.97± 0.84	40.37± 0.64	37.21± 1.27	39.50± 0.79	38.31± 0.81
после проведения эксперимента								
эритроциты	x10 ¹²	6–7.5	6.10± 0.33	6.52± 0.27	6.86± 0.25	7.24± 0.21*	6.88± 0.22*	7.11± 0.30
лейкоциты	x10 ⁹	8–16	19.28± 0.87	19.03± 0.64	16.90± 0.88	16.22± 0.83	16.53± 0.71	16.76± 0.66
гемоглобин	г/л	90–110	94.20± 1.37	97.20± 1.29	97.52± 1.18	101.27± 1.56*	98.32± 1.91	101.68± 1.97*
гематокрит	%	42	42.43± 1.13	41.31± 0.70	39.06± 1.21	38.64± 1.02	39.65± 0.83	39.24± 0.92

Примечание – * $P < 0,05$

Также в опытной группе наблюдалось максимальное увеличение количества эритроцитов относительно первичного исследования, что составило 4,32%. Минимальная разница между контрольной и опытными группами по количеству эритроцитов была зафиксирована в первой опытной группе – она составила 6,89%, однако у животных этой же группы произошло снижение количества эритроцитов относительно показателя вначале эксперимента. Снижение составило 2,25%. Следует также отметить уменьшение эритроцитов в контрольной группе относительно начала опыта на 16,44%.

Количество лейкоцитов вначале эксперимента соответствовало физиологической норме для данного вида и возраста животных. Максимальное количество лейкоцитов составляло $14,87 \times 10^9$ /л в пятой группе, а минимальное количество – в первой опытной группе $12,17 \times 10^9$ /л. При повторном исследовании гематологических показателей количество лейкоцитов резко увеличилось в контрольной и первой опытной группах и превысило физиологическую норму, в то время как у остальных животных в опытных группах данный показатель находился на верхней границе физиологической нормы или незначительно её превышал. Так, разница между контролем и первой опытной группой составила 1,3%, а разница между первичным и заключительным исследованием достигла уровня 51,81% у животных контрольной группы, а 1 опытной – 56,37%. Максимальная разница между контролем и опытом составляла 15,87% в третьей группе.

Уровень гемоглобина по окончании эксперимента снизился относительно первичного исследования крови в контрольной группе на 7,98%.

Можно отметить, что колебания данного показателя были незначительны в опытных группах и в трёх из пяти не превысили 1,5%. Уровень гемоглобина повысился лишь в третьей опытной группе на 3,21% – это был наилучший показатель. При сравнении количества гемоглобина относительно контроля наибольшее превышение было в опытных группах 5 и 3 и составило 7,94% и 7,51% соответственно.

Максимальный уровень гематокрита был зафиксирован на уровне 42,43% в контрольной группе, что незначительно превышает физиологическую норму. Его наименьший уровень зафиксирован в третьей группе и составляет 38,64%. В процессе эксперимента максимальное увеличение гематокрита зафиксировано в опытной и первой контрольной группах – 8,24% и 8,80% соответственно. Его снижение было отмечено во второй опытной группе – на уровне 39,06%. Однако наименьшее значение (38,64%) наблюдалось в третьей опытной группе, в ней увеличение относительно начала эксперимента составило 3,84%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате гематологического анализа было выявлено положительное влияние на показатели крови опытных животных комплексного препарата для лечения и профилактики микотоксикозов животных «Биотокс». Так, в третьей и четвёртой опытных группах отмечается достоверное изменение количества эритроцитов: $7,24 \pm 0,21$ ($p < 0,05$) и $6,88 \pm 0,22$ ($p < 0,05$) относительно контроля, а в группах 3 и 5 к окончанию исследований было выявлено достоверное изменение уровня гемоглобина: $101,27 \pm 1,56$ ($p < 0,05$) и $101,68 \pm 1,97$ ($p < 0,05$) соответственно. Наблюдается тенденция к снижению уровня лейкоцитов и гематокрита в опытных группах, которым применялся «Биотокс» в дозе 1 кг/т и более, что свидетельствует о стабильном состоянии животных, отсутствии явных патологических процессов в период исследований.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Сэнтин, Э. Рост плесневых грибов и продуцирование микотоксинов / Э. Сэнтин // Оценка взаимодействия микотоксинов в Европе. Европейский семинар по микотоксинам. – 2005. – С.27–42.
- 2 Орлянкин, Б.Г. Проблемы микотоксикозов свиней в промышленном свиноводстве / Б.Г. Орлянкин // Сельскохозяйственный вестник. Зооинженерия. – 2006. – №4. – С.16.
- 3 Райхенбах, Х. Микотоксины опасны для свиней / Х. Райхенбах // Комбикорма. – 2005. – №2. – С. 71.
- 4 Гогин, А. Микотоксины: эффективный контроль – эффективное производство / А. Гогин // Комбикорма. – 2005. – №2. – С.68.
- 5 О'Сулливан, Д. Микотоксины – бесшумная опасность / Д. О'Сулливан // Комбикорма. – 2005. – №5. – С.54.

УДК 636.5.053:612.015.31

**ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА «ИНТРОВИТ А+ОРАЛ» НА
БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ
И КАЧЕСТВО ПОЛУЧАЕМОЙ ОТ НИХ ПРОДУКЦИИ**

А.В. ОСТРОВСКИЙ, Е.А. ЮШКОВСКИЙ, П.И. ПАХОМОВ

*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия
ветеринарной медицины», Витебск, РБ*

Поступила в редакцию 25.06.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Знание физиологических закономерностей обменных процессов у птиц создает основу для рационального использования кормов, разработки мер профилактики заболеваний, повышения сохранности и продуктивности птицы. В связи с этим проблема нормализации обмена веществ при назначении различных биологически активных веществ продолжает оставаться актуальной [5].

Многочисленные исследования ученых направлены, прежде всего, на изучение физиологических и биохимических механизмов регуляции и повышения интенсивности процессов обмена веществ, позволяющих с наибольшей эффективностью использовать биологический потенциал организма птиц к биосинтезу необходимых человеку мяса, яиц [2, 6].

Однако, несмотря на имеющиеся разработки по интенсивным технологиям получения продукции животноводства, широко распространены заболевания, связанные с нарушением обмена веществ, которые ведут к снижению роста, развития, продуктивности, воспроизводительной способности, а зачастую и сохранности поголовья птицы, вследствие чего дорожает продукция, в ней накапливаются вещества, превышающие допустимые остаточные количества, применяемые для интенсификации животноводства, ухудшающая технологические свойства мяса и яиц [1, 7].

В этой связи определенного внимания заслуживает использование в птицеводстве некоторых биологически активных веществ, как средств малотоксичных, безопасных в экологическом плане и обладающих достаточно высокой биологической активностью [3, 4, 8].

Нами поставлена цель – исследовать некоторые показатели белкового, углеводного и липидного обмена у цыплят-бройлеров в ОАО «Кленовичи» Крупского района Минской области при использовании препарата «Интровит А+Орал» и влияние его на доброкачественность мяса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа проводилась в 2014 г. в ОАО «Кленовичи» Крупского района Минской области, на кафедрах нормальной и патологической физиологии, ветеринарно-санитарной экспертизы УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» и в центральной научно-исследовательской лаборатории НИИ ПВМ и Б УО ВГАВМ.

Объектом для исследования служили цыплята-бройлеры кросса

РОСС-308. В суточном возрасте из них было сформировано по принципу аналогов две группы – контрольная и опытная – по 100 цыплят в каждой. Цыплята-бройлеры содержались в одинаковых условиях и получали одинаковый рацион, при этом цыплятам опытной группы включали препарат «Интровит А+Орал» внутрь с питьевой водой в дозе 5 мл на 10 л воды, начиная с 12-дневного до 17-дневного возраста. В контрольной группе цыплята-бройлеры получали базовый препарат «Комбисол».

Материалом для изучения биохимических показателей крови у цыплят-бройлеров в 13-дневном, 33-дневном и 42-дневном возрасте служила сыворотка крови, которую получали после центрифугирования крови в течение 10 мин при 3000 об/мин.

Из биохимических показателей в сыворотке крови определяли содержание общего белка, альбуминов, глюкозы, триглицеридов, мочевой кислоты и холестерина.

При изучении ветеринарно-санитарных показателей определяли органолептические показатели, бактериальную обсемененность, физико-химические показатели, биологическую ценность и безвредность мяса. Исследования проводили согласно действующим ТНПА [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

У цыплят-бройлеров контрольной группы в 13-дневном возрасте уровень общего белка составил $24,41 \pm 2,18$ г/л. К 33-дневному возрасту отмечалось постепенное увеличение этого показателя до $33,42 \pm 3,27$ г/л, а в 42-дневном возрасте – незначительное снижение.

В опытной группе цыплят-бройлеров динамика содержания общего белка отмечалась как и в контрольной группе, и его количество находилось в пределах $26,17 \pm 2,11$ – $34,61 \pm 1,25$ г/л.

Содержание альбуминов у цыплят-бройлеров контрольной группы имело тенденцию к повышению с $11,36 \pm 0,76$ г/л в начале опыта до $13,7 \pm 1,76$ г/л к 33-дневному возрасту, что на 17 % больше по сравнению с предыдущей возрастной группой ($p < 0,05$), а к концу эксперимента снизилось до $12,03 \pm 1,03$ г/л. В опытной группе наблюдалась такая же динамика изменения уровня альбуминов. Причем, добавление препарата «Интровит А+Орал» способствовало повышению содержания альбуминов в опытной 42-дневной группе на 18,3 % ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой.

Концентрация мочевой кислоты у цыплят-бройлеров 13-дневного возраста была практически на одном уровне и составила в среднем 330 ммоль/л. Но к концу эксперимента у цыплят-бройлеров контрольной группы по сравнению с 13-дневными цыплятами этот показатель увеличился до $416,25 \pm 10,15$ ммоль/л ($p < 0,05$). В опытной группе, по мере роста птицы, этот уровень мочевой кислоты также увеличивался, причем его содержание было ниже на 12,2% в 42-дневной опытной группе, чем в контрольной ($p < 0,05$).

Концентрация глюкозы в крови цыплят-бройлеров обеих групп была самой низкой в начале опыта, и по мере взросления цыплят уровень глюкозы увеличивался и у 42-дневных цыплят-бройлеров контрольной группы составил $9,12 \pm 0,55$ ммоль/л, а в опытной – $9,74 \pm 0,15$ ммоль/л соответственно.

Содержание триглицеридов также самым низким было у 13-дневных цыплят-бройлеров контрольной группы, а к 42-дневному возрасту составило

1,43±0,55 ммоль/л, что в 2,8 раза больше по сравнению с 13-дневными цыплятами ($p<0,05$). В опытной группе концентрация триглицеридов была практически такая, как и в контрольной группе.

В содержании холестерина положительная динамика отмечена у 33-дневных цыплят, в последующем этот показатель снизился в обеих группах. Применение препарата «Интровит А+Орал» способствовало снижению уровня холестерина на 14,5 % ($p<0,05$) по сравнению с цыплятами-бройлерами контрольной группы.

Анализируя производственные показатели цыплят-бройлеров, следует отметить, что наиболее интенсивный рост отмечен с 21-го по 33-й день выращивания. Живая масса в 42 дня составила 2379,1±23,15 г в контроле и 2425,0±11,54 г в опыте. Величина среднесуточных привесов в группах за период выращивания составила в контроле 56,6 г, в опыте – 57,7 г соответственно.

Сохранность цыплят была выше в опытной группе и составила 97,0% против 94,0% в опыте. Повышение сохранности и среднесуточного прироста в опытной группе может быть связано с действием препарата «Интровит А+Орал», который способствует нормализации обменных процессов у цыплят-бройлеров, что в итоге приводит к лучшей усвояемости корма.

С целью изучения влияния препарата на доброкачественность мяса, было отобрано 15 тушек цыплят-бройлеров. Для контроля использовали 3 тушки птицы, не получавших препарат.

В результате проведенных органолептических исследований тушек птицы установлено: слизистая оболочка ротовой полости незначительно увлажнена; клюв глянцевый, глазное яблоко выпуклое, роговица блестящая; поверхность всех тушек сухая, желтовато-серого цвета с красноватым оттенком; мышцы на разрезе слегка влажные, бледно-розового цвета, упругой консистенции; запах специфический, свойственный свежему мясу птицы.

При пробе варкой бульон во всех случаях был прозрачный, ароматный, постороннего запаха не установлено.

Бактериологическими исследованиями обсемененность микроорганизмами мышечной ткани и внутренних органов не установлена.

При изучении физико-химических показателей мяса установлено, что реакция на аммиак и соли аммония как в опытной, так и в контрольной группе во всех случаях была отрицательная. Это свидетельствует о том, что в организме птицы не происходит нарушение белкового обмена. Реакция на пероксидазу в подопытных группах во всех случаях была положительной, т.е. этот фермент остается активным.

Кислотное число жира в опытной группе было 0,79±0,06 мгКОН, а в контроле – 0,71±0,01.

Перекисное число жира также не превышало допустимых уровней и находилось в пределах 0,007–0,008 % йода (при норме до 0,01). То есть применение «Интровит А+Орал» не оказывает отрицательного влияния на процессы жирового обмена и, судя по этим показателям, мясо также является доброкачественным.

Реакция среды (рН) мяса является одним из важнейших показателей, дающих представление о полноте происходящих в мясе послеубойных изменений, в результате которых мясо приобретает желательные качествен-

ные показатели. В ходе эксперимента было установлено, что при использовании «Интровит А+Орал» этот показатель составил $5,90 \pm 0,03$, а в контрольной группе – $5,89 \pm 0,05$, то есть реакция среды мяса при использовании птице добавки находится в пределах нормы и практически не отличается от контрольных проб.

Относительная биологическая ценность мяса птицы, в рацион которой вводился препарат, была на 1,4% выше, чем в контроле. Таким образом, применение испытуемой добавки способствует повышению биологической ценности мяса птицы.

При изучении безвредности мяса птицы увеличение мертвых клеток и угнетенный рост инфузорий во всех пробах не наблюдались. Это свидетельствует о том, что применение «Интровит А+Орал» не влияет на безвредность мяса и не обладает токсичностью для тест-объекта инфузорий Тетрахимена пириформис.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что применение в рационе цыплят-бройлеров препарата «Интровит А+Орал» приводит к повышению биосинтеза белка, усилению синтеза эндогенных жиров, необходимых для удовлетворения энергетических затрат, улучшает транспорт холестерина в клетках и тканях.

Эти различия можно объяснить стимулирующим действием препарата «Интровит А+Орал», в состав которого входят витамины, а также ряд незаменимых аминокислот, что позволяет более эффективно использовать применяемые корма при их выращивании.

Мясо цыплят-бройлеров, в рацион которых входил «Интровит А+Орал», по органолептическим, бактериологическим, физико-химическим показателям, а также биологической ценности и безвредности не уступает мясу контрольной группы. Таким образом, использование препарата не оказывает отрицательного влияния на доброкачественность мяса и оно может быть использовано на пищевые цели без ограничений.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Акбаев, М.Ш. Резервы повышения продуктивности бройлеров / М.Ш. Акбаев [и др.] // *Птицеводство*. – 2003. – № 7. – С. 5.
- 2 Антипова, Л. Влияние способов содержания цыплят – бройлеров на качество мяса / Л. Антипова, В. Бердников, О. Петров // *Птицеводство*. – 2005. – № 2. – С. 8–10.
- 3 Биологически активные и кормовые добавки в птицеводстве / В.И. Фисинин [и др.] – Сергиев Посад, 2009. – 100 с.
- 4 Ветеринарно-санитарные правила ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов.: Утв. Гл. упр. ветеринарии МСХ и П РБ, 15.04.2008. Минск, 2008. – 102 с.
- 5 Гаврикова, Л.М. Совершенствование способов полноценного кормления и содержания цыплят-бройлеров и кур несушек / Л.М. Гаврикова // *Птица и птицепродукты*. – 2007. – № 2. – С. 42–43.
- 6 Гуцин, В.В. Повышение качества и снижение потерь мяса птицы на стадиях производства: автореферат дис. докт. с.-х. наук. – Сергиев Посад, 2004. – 44 с.
- 7 Егоров, И. Научные основы использования кормов в промышленном птицеводстве / И. Егоров // *Кормление сельскохозяйственных животных и кормопроизводство*. – 2006. – № 8. – С. 67–68.

УДК 619:615.28:614.48

СРЕДСТВО КРИОКС ДЛЯ ДЕЗИНФЕКЦИИ ЖИВОТНОВОДЧЕСКИХ ПОМЕЩЕНИЙ ПО СОДЕРЖАНИЮ ТЕЛЯТ

Л.Л. КРИВЕНОК, Т.Н. КАМЕНСКАЯ, С.А. ЛУКЬЯНЧИК,
И.И. КУЗЬМИНСКИЙ, М.И. ЧЕРНИК

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского»,
г. Минск РБ*

Поступила в редакцию 10.08.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Дезинфекция является обязательным и важным мероприятием в очагах инфекционных заболеваний, а также для профилактики заболеваний с целью предотвращения микробиологического загрязнения помещений, приборов, оборудования, транспорта и т.д.

Для дезинфекции предложено большое количество химических соединений, однако жесткие требования, предъявляемые к средствам дезинфекции, прежде всего такие, как обеспечение высокой эффективности дезинфекции и отсутствие неблагоприятного действия на людей, животных и растения, позволяют использовать на практике лишь ограниченное число препаратов [1, 2].

В последнее время в Республике Беларусь и других странах активно проводятся исследования по созданию композиций на основе перекиси водо-

рода – сочетаний активно действующего вещества с полезными добавками к ним с целью получения высокоэффективных и безвредных препаратов.

В Республике Беларусь было разработано средство дезинфицирующее «Криокс» ТУ ВУ 600049853.188–2014 (далее – средство). Средство внесено в Государственный реестр ветеринарных препаратов, зарегистрированных в Республике Беларусь под № 4744–10–14 БД, срок действия 27.11.14–24.10.19.

В состав указанного средства входят перекись водорода, система стабилизаторов, система активаторов и вода. При сочетании компонентов, входящих в препарат, наблюдается их синергизм, что позволяет уменьшить концентрации активных веществ, снизить повреждающее воздействие на материалы и оборудование, уменьшить токсичность. Используемая в средстве система активаторов помимо антимикробных свойств имеет моющие свойства.

Средство обладает антимикробным, вирулицидным, фунгицидным и протопидным действием по отношению к группам малоустойчивых (первая группа), устойчивых (вторая группа) и высокоустойчивых (третья группа) возбудителей, активно к возбудителям которые вызывают заболевания у пчел таким, как *Melissococcus pluton*, *Bacillus alvei*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus paraalvei*, *Pseudomonas apisepticum*, *Ascosphaera apis*, *Nosema apis*, *Malpighamoeba mellifica*. Механизм действия средства заключается в его высокой окислительной активности. Выделяющийся кислород окисляет сульфгидрильные и гидроксильные группы белков и липидов, вызывая гибель микробов и простейших. По степени воздействия на организм средство относится к умеренно опасным веществам (3-й класс опасности по ГОСТ 12.1.007–76). Рабочие растворы не обладают местно раздражающим и сенсибилизирующим действием, не вызывают коррозии металлов, не разрушают пластмассу, резину и другие материалы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Производственные испытания средства проводились согласно программе по проведению испытаний, утвержденной в установленном порядке. Испытания проводились по разработанной схеме методом полива и мелкодисперсными аэрозолями холодного тумана в присутствии животных. Опыты были проведены в животноводческих помещениях по содержанию телят в возрасте от 1,5 до 3 месяцев в хозяйствах Республики Беларусь.

После освобождения от животных помещения подвергались тщательной механической очистке. После этого проводилась дезинфекция 1,0 % раствором средства методом полива из расчета 0,5 л/м². Экспозиция после обработки составляла 3 ч. Для дезинфекции использовалась дезинфекционная установка Комарова (ДУК). Контроль качества дезинфекции проводился согласно «Методическим указаниям по контролю качества дезинфекции и санитарной обработке объектов, подлежащих ветеринарно-санитарному надзору» (Минск, 2007). Определяли общую микробную обсемененность и наличие санитарно-показательной микрофлоры (стафилококков, кишечной палочки, грибов, спорообразующих бактерий).

Контрольные помещения обрабатывались также методом полива с

использованием ДУК рабочим раствором отечественного дезинфицирующего средства «Оксон» согласно инструкции по применению.

Для проведения опытов по аэрозольной санации животноводческих помещений в присутствии телят первого периода выращивания после комплектования групп проводилась аэрозольная обработка 3,0 % рабочим раствором средства из расчета $20 \text{ см}^3/\text{м}^3$ с использованием генератора холодного тумана «Циклон» (Литва) при отключенной вентиляции, закрытых окнах и дверях. Экспозиция после обработки составляла 1 ч. В контрольных помещениях аэрозольная санация не осуществлялась.

В процессе опыта проводились бактериологические исследования воздуха на уровне нахождения животных методом седиментации по Коху на чашки Петри с селективными средами. Патогенность выделенных культур проверялась на белых мышах по общепринятым методикам.

В опыте исследовалось влияние обработок препаратом в присутствии животных на биохимические и гематологические показатели организма. Учитывали количество микрофлоры на слизистых оболочках носовых ходов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На основании проведенных исследований установлено, что при качественной дезинфекции животноводческих помещений перед заполнением их животными через 10–15 дней после заполнения наблюдается высокое по сравнению с нормативом содержание микробов, в т.ч. патогенных, что оказывает негативное влияние на организм сельскохозяйственных животных, вызывая микробный стресс.

Помещения для содержания телят на комплексе по откорму крупного рогатого скота, где впоследствии была проведена санация средством «Криокс» в присутствии животных, представляют собой типовые здания с приточно-вытяжной вентиляцией. Удаление навоза производится транспортером, содержание животных – на бетонных полах. Помещение объемом 4500 м^3 и площадью 1700 м^2 разделено на 28 клеток по 15–18 животных в каждой.

После дезинфекции методом полива через 3 ч рост микробов отсутствовал, через 24 ч после обработки выделялись единичные микроорганизмы, непатогенные для лабораторных животных. На поверхности обеззараживаемых объектов бактерий группы кишечной палочки, стафилококков и спорообразующих микроорганизмов не выделено, что свидетельствует об удовлетворительном качестве проведенной дезинфекции (таблица 1).

Таблица 1 – Бактериологические исследования смывов с поверхностей помещения для выращивания молодняка крупного рогатого скота до и после обработки средством «Криокс» методом полива

Объект	ОМО, КОЕ/см ²			Эндо			Солевой МПА			Сабуро			Кровяной МПА		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
пол	1350200 ±15600	–	10280 ±520	+	+	+	–	–	+	–	–	+	–	–	–
стена	980000 ±11400	–	5200 ±400	+	–	–	+	–	–	+	–	–	+	–	–
кормушка	925400 ±10300	–	3850 ±200	+	–	–	+	–	–	+	–	+	+	–	–
поилка	680900 ±6500	–	1200 ±150	+	–	–	+	–	–	+	–	–	+	–	–

Примечание – 1 – до дезинфекции; 2 – через 3 ч после дезинфекции; 3 – через 24 ч после дезинфекции; ОМО – общая микробная обсемененность; (+) – рост культур на среде; (–) – рост на среде отсутствует; (+*) – выделенные культуры патогенные для лабораторных животных; КОЕ – колониеобразующих единиц

После проведения дезинфекции в помещении были размещены телята в возрасте 1,5–2,0 месяца, которые были разделены на 2 группы по 220 голов.

Аэрозольная обработка средством в процессе выращивания животных проводилась по следующей схеме: при комплектовании групп ежедневно 3 дня подряд, в дальнейшем – 1-й месяц дважды в неделю с интервалом 3–4 дня, 2-й месяц и до окончания технологического периода – один раз в 7 дней. Схема была отработана заранее в хозяйственном опыте, очередная санация проводилась, когда микробный фон был выше допустимого уровня. Санация помещений в присутствии животных в течение всего опыта по предложенной схеме обеспечивала поддержание уровня общей микробной обсемененности воздуха в пределах нормативных показателей для данных его вида и возраста животных (до 40 000 КОЕ/м³).

В контрольном помещении, где аэрозольная обработка не проводилась, количество микробов за период наблюдения возрастало в 2,5 раза и более по сравнению с исходным уровнем и превышало нормативы микробной обсемененности воздуха (таблица 2).

Таблица 2 – Общая микробная обсемененность (КОЕ/л воздуха) воздуха при проведении аэрозольной дезинфекции в присутствии телят средством «Криокс»

Группа	Сроки проведения дезинфекции										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
опытная	95200 ±3300	70900 ±1700	57300 ±1200	42300 ±800	40800 ±400	39900 ±470	39000 ±150	38800 ±400	38100 ±250	37200 ±255	37000 ±150
контрольная	110400 ±6500	120400 ±2300	144200 ±6500	156400 ±8700	170200 ±3200	180880 ±12730	200100 ±17000	210300 ±10200	280100 ±9100	310700 ±6900	370500 ±10300

Примечание – 1 – при комплектовании стада один раз в сутки; 2 – через 24 ч после 3-й (4-я); 3 – через 24 ч после 4-й (5-я); 4 – через 3 дня после 5-й (6-я); 5 – через 4 дня после 6-й (7-я); 6 – через 4 дня после 7-й (8-я); 7 – через 4 дня после 8-й (9-я); 8 – 10-я один раз в 7 дней; 9 – 11-я один раз в 7 дней; 10– 12-я один раз в 7 дней; 11 – 13-я один раз в 7 дней

Биохимические показатели крови телят опытной и контрольной групп находились в пределах физиологической нормы. Однако у телят опытной группы отмечалась тенденция к увеличению общего белка сыворотки крови, БАСК, титра нормальных агглютининов (таблица 3).

Таблица 3 – Гематологические показатели телят, находившихся в опыте по аэрозольной санации средством «Криокс»

Группа	Гемо- глобин, г/л	Эрит- роциты 10 ¹² /л	Лейко- циты, 10 ⁹ /л	Общий белок, г/л	ТНА	БАСК, %	Фагоцитарная активность нейтрофилов		
							1	2	3
в начале опыта									
опыт	116,9± 3,1	6,05± 0,12	7,10± 0,30	60,9± 0,33	1:8± 1,2	73,1± 2,2	85,4± 1,90	2,81± 0,10	3,24± 0,19
контроль	117,0± 3,2	6,10± 0,22	7,08± 0,25	61,9± 0,49	1:8± 1,4	73,8± 2,3	86,2± 1,88	2,74± 0,11	3,21± 0,10
в конце опыта									
опыт	125,4± 4,1	6,25± 0,11	7,30± 0,20	68,7± 2,13	1:16 ±1,6	76,9 ±2,1	88,1± 1,75	2,83± 0,11	3,29± 0,18
контроль	119,3± 3,2	6,11± 0,14	7,17± 0,24	63,2± 1,92	1:10± 2,8	73,9± 2,2	87,3± 1,49	2,79± 0,10	3,19± 0,16

Примечание – ТНА – Титр нормальных агглютининов; БАСК – бактерицидная активность сыворотки крови; 1 – % фагоцитоза; 2 – фагоцитарное число; 3 – фагоцитарный индекс

У телят опытной и контрольной групп во время опыта были отобраны смывы со слизистой оболочки верхних дыхательных путей. До обработки у телят опытной группы количество микроорганизмов в смывах в среднем составляло 75 800 КОЕ/см³, после однократной обработки средством «Криокс» через 24 ч – 14 300 КОЕ/см³, после трех обработок – 8400 КОЕ/см³, в конце опыта – 4200 КОЕ/см³. В контрольной группе количество микробов в смывах из носовой полости составило 77200, 87900 и 95400 КОЕ/см³ соответственно (таблица 4).

Таблица 4 – Бактериологические исследования смывов слизистых оболочек носовой полости телят до и после аэрозольной санации рабочим раствором средства «Криокс»

Группа	Название питательной среды						
	МПА, КОЕ/см ³	Эндо	ВСА	СМПА	КМПА	Сабуро	Китт-Тароцци
до санации							
опыт	75800±2400	5+	5-	5+	5+	5+	1+, 4-
контроль	77200±2200	5+	5-	5+	5+	5+	2+, 3-
после санации через 24 ч							
опыт	14 300±950	1+, 4-	5-	2+, 3-	2+, 3-	5-	5-
контроль	87000±4500	5+	5-	5+	5+	5+	2+, 3-
в конце опыта							
опыт	4200±100	5-	5-	5-	5-	5-	5-
контроль	95400±11500	5+	5-	5+	5+	5+	2+, 3-

Примечание – МПА – мясо-пептонный агар; ВСА – висмут сульфит агар; СМПА – солевой мясопептонный агар; КМПА – кровяной мясопептонный агар; (–) – отсутствие роста; (+) – наличие роста

На дифференциальных средах до санации помещения из смывов с носовой полости выделялись грибы, кишечная палочка (патогенная), протей и кокковая микрофлора (патогенная). Через 24 ч после 1-й обработки средством выделялась кокковая микрофлора (патогенная), после 3-й обработки в смывах с носовых ходов выделяемая микрофлора не была патогенной для белых мышей.

Падежа за период проведения испытаний не наблюдалось.

Проведенные испытания по аэрозольной санации воздуха средством «Криокс» в помещениях для содержания молодняка сельскохозяйственных животных показали, что обработка воздуха помещений в присутствии животных согласно предложенной схеме позволяла удерживать микробный фон в допустимых нормативами значениях для данной группы животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1 Обработка помещений животноводческого комплекса по содержанию молодняка крупного рогатого скота перед вводом в них телят средством «Криокс» в 1,0 % концентрации и расходом 0,5 л/м² методом полива обеспечивает удовлетворительное качество дезинфекции.

2 Аэрозольная санация средством «Криокс» в присутствии телят (1,5–2 месяца) 3,0 % рабочим раствором из расчета 20 см³/м³ согласно разработанной схеме (при комплектовании групп – 3 дня подряд, затем, в 1-й месяц содержания, – дважды в неделю с интервалом 3–4 дня, 2-й месяц и до окончания технологического периода – один раз в 7 дней) позволяет сохранять микробный фон в помещениях для животных в пределах допустимых нормативов (до 40 000 КОЕ/м³).

3 При проведении санации поверхностей аэрозолями средства в присутствии животных по разработанной схеме отклонений в гематологических показателях и клиническом состоянии животных не наблюдалось, микробная обсемененность верхних дыхательных путей у подопытных животных снижалась по сравнению с первоначальными данными.

ЛИТЕРАТУРА

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

2 Лях, Ю.Г. Влияние длительного периода эксплуатации животноводческих помещений на микробиологическое состояние объекта / Ю.Г. Лях, Л.А. Крот, А.Э. Высоцкий, В. П. Балаболов, С.А. Иванов // Ветеринарная медицина Беларуси. – 2004. – №4. – С. 10–11.

УДК 619:615.4:637.5.07-12.05

ВЛИЯНИЕ ИНСЕКТО-АКАРИЦИДНОГО ПРЕПАРАТА «ЦИПЕРВЕТ» НА КАЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ МЯСА И МОЛОКА

М.В. ЯКУБОВСКИЙ¹, Ю.В. ГРИГОРЬЕВ², Т.Я. МЯСЦОВА¹,
Т.Н. КАМЕНСКАЯ¹, С.А. ЛУКЬЯНЧИК¹, Т.Н. АНДРЕЕВА²

¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии
им. С.Н. Вышеселского, г. Минск, РБ

²УБГУ «Научно-исследовательский институт
физико-химических проблем» (НИИ ФХП БГУ), г. Минск, РБ

Поступила в редакцию 01.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для борьбы с эктопаразитами у животных широко используются препараты на основе синтетического пиретроида циперметрина (суммы изомеров или определенного изомера) в различных растворителях. При этом сроки использования животноводческой продукции после их применения рекомендуются различные. Так, при использовании **эктомина** (с цис-изомерами фирмы «Сибя-Гейги») в разведении 1:1000 убой животных разрешается через 3 дня, а молоко для пищевых целей используется без ограничений [1], для эктомина производства фирмы «Новартис» Швейцария соответственно – через 10 дней и 3 дня [2], Мустанг 100в.э. – 10 и 3 дн. [3], Биорекс-ГХ – 25 и 12 дн. [4], Циперметрин 25% к.э. – без ограничений [5], Бутокс 50 – без ограничений [6] и т.д.

Нами установлены сроки ожидания при применении препарата «Ципервет» – молоко используется без ограничений и убой животных на мясо разрешается через 10 дней после последней обработки этим препаратом [7].

Далее перед нами стояла задача определить качественные показатели мяса и молока после применения ципервета.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования по определению качества мяса и молока провели в отделе паразитологии и лаборатории экологии и ветеринарной санитарии института.

Определение качества мяса при применении инсекто-акрицидного препарата «Ципервет» провели на кроликах. Для этого было сформировано 5 групп кроликов по три головы в каждой массой тела 2–3 кг, в т.ч. 1 контрольная и 4 опытные. Кроликов 2–5 групп обработали путем мелкокапельного опрыскивания всей поверхности тела 0,01% -ной водной эмульсией ципервета в количестве 50 мл на голову с последующим втиранием (по ДВ 150 мг/кг массы тела). Убой животных контрольной группы (1 гр.) провели до обработки. Убой кроликов опытных групп провели: 2 гр. – через 2 дня, 3 гр. – через 5 дней, 4 гр. – через 7 дня и 5 гр. – через 9 дней после обработки.

Определение качества молока провели в СПК «Щемяслица» Минского района. Для этого сформировали группу из 3 дойных коров и обрабатывали путем мелкокапельного опрыскивания водной эмульсией препарата в концентрации 0,01% с расходом 1,5 л на одно животное однократно. Отбор проб молока у всех коров провели до обработки, через 12 ч., 24, 36, 48 и 72 часа после обработки. Отбор проб молока проводили с максимальным соблюдением стерильности. Вымя и соски обмывали теплой водой, а затем обрабатывали стерильной салфеткой, смоченной 70° спиртом ректификованным. Первые порции молока сдаивали, а затем молоко сдаивали в стерильные флаконы через стерильные марлевые фильтры. Молоко сразу охлаждали путем неоднократной смены холодной воды. Транспортировали флаконы с молоком в сосуде с холодной водой. Исследования качества молока проводили согласно ТНПА: СТБ 1598–2006 «Молоко коровье. Требования при закупках» и Изменения № 1 к СТБ 1598–2006 «Методические указания по токсико-биологической оценке мяса, мясных продуктов и молока с использованием инфузорий тетрахимена пириформис» (утв. ГУВ МСХП РБ, 1997 г.), ГОСТ 23454–79 «Молоко. Методы определения ингибирующих веществ».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1 Качественные показатели мяса кроликов

1.1 По органолептическим показателям после обработки «Циперветом» тушки кроликов были хорошо обескровлены, суставные поверхности и сухожилия влажные, плотные, упругие, гладкие. Мышцы на разрезе слегка влажные, не липкие; после надавливания на мясо ямка быстро выравнивалась, что свидетельствовало об его упругой консистенции. Запах поверхностного слоя мяса специфический для данного вида животных (кролики), характерный для свежего, цвет мяса – бледно-розовый.

1.2 Дегустационная оценка по 9-бальной системе показателей качества бульона образцов мяса кроликов, убитых в различные сроки после обработки циперветом свидетельствует о том, что внешний вид и цвет бульона очень хороший с приятным и сильным запахом (ароматом), наваристый и вкусный с оценкой 8,25 балла.

1.3 Дегустационная оценка по 9-бальной системе показателей качества мяса, показала, что мясо имело очень хороший внешний вид, приятный и сильный запах, вкус вкусный, мясо нежное и сочное. Общая оценка составила 8,0 баллов.

1.2 Результаты бактериологического исследования образцов мяса кроликов после обработки циперветом представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Микробиологическая чистота мяса кроликов

День исследования	Микроскопия		Общая микробная обсемененность, КОЕ/г	Рост микрофлоры				Биопроба с тетрахименной пириформис
	наличие микроорганизмов в мазках отпечатках с поверхности мяса	распад тканей		энтеро-патогены	кокки	спорообразующие	анаэробы	
до обработки	единичные кокки	отсутствует	18,0±1,2	отсутствует	8	отсутствует	отсутствует	отрицательная
после обработки через 2 дня			16,0±0,8		7			
5			10,3±0,8		10			
7			14,3±0,8		2			
9			11,8±0,8		4			

1.3 Физико-химические показатели мяса кроликов после обработки «Циперветом» представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Физико-химические свойства мяса

Показатель	Срок хранения при 2°C, часы	День исследования				
		до обработки	после обработки через, дней			
			2	5	7	9
реакция среды, pH единиц	24	5,65±0,07	5,53±0,01	5,49±0,02	5,56±0,04	5,58±0,01
реакция с раствором CuSO ₄	24	отрицательная				
реакция на аммиак	24	отрицательная				
летучие жирные кислоты, мг КОН	24	1,94±0,09	2,09±0,08	1,87±0,09	1,87±0,09	1,72±0,08
аминоаммиачный азот, мг КОН	24	0,37±0,01	0,52±0,02	0,48±0,03	0,44±0,04	0,43±0,02

1.4 Данные относительной биологической ценности и безвредности мяса кроликов после обработки циперветом представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Биологическая ценность мяса кроликов

День исследования	Мясо, количество инфузорий			
	1 опыт	2 опыт	3 опыт	средняя
до обработки	130	134	162	142±11,6
после обработки через 2 дня	142	144	102	129±16,0
5	143	170	120	144±14,8
7	136	158	142	145±7,3
5	134	138	134	135±1,5

2 Качественные показатели молока коров

2.1 Результаты исследований по органолептическим и физико-химическим показателям молока коров, обработанных циперветом представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Качественные показатели молока

Время отбора проб молока	Показатели	Норма для молока класса «Экстра»	Фактические данные
1	2	3	4
до обработки	цвет	белый или белый с желтоватым или кремовым оттенком	белый с кремовым оттенком
через 12 ч			
24 ч			
36 ч			
48 ч			
72 ч			
до обработки	консистенция	однородная жидкость без осадка, сгустков хлопьев белка	однородная жидкость без осадка, сгустков хлопьев белка
через 12 ч			
24 ч			
36 ч			
48 ч			
72 ч			
до обработки	запах	чистый, свойственный коровьему молоку, без посторонних запахов	чистый, свойственный коровьему молоку, без посторонних запахов
через 12 ч			
24 ч			
36 ч			
48 ч			
72 ч			
до обработки	титруемая кислотность, °Т	от 16 до 18 включительно	16,10±0,06
через 12 ч			16,13±0,03
24 ч			16,03±0,03
36 ч			16,23±0,12
48 ч			16,16±0,03
72 ч			16,10±0
до обработки	плотность, кг/м ³	1028,0	1028,03±0,03
через 12 ч			1028,10±0,06
24 ч			1028,07±0,06
36 ч			1028,0±0
48 ч			1028,03±0,03
72 ч			1028,0±0

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4
до обработки	общее количество микроорганизмов, КОЕ/см ³	до 100 000	12 000±529
через 12 ч			11 800±503
24 ч			13 600±1 861
36 ч			13 233±530
48 ч			10 933±371
72 ч			11 366±726
до обработки	количество соматических клеток в 1 см ³ , не более	300 000	53 333±12 018
через 12 ч			66 666±12 018
24 ч			66 666±14 529
36 ч			56 666±12 018
48 ч			40 000±15 275
72 ч			46 666±6 666
до обработки	реакция с беломасином	отрицательная	отрицательная
через 12 ч			
24 ч			
36 ч			
48 ч			
72 ч			
до обработки	наличие ингибирующих веществ	отсутствуют	отрицательная
через 12 ч			
24 ч			
36 ч			
48 ч			
72 ч			

2.2 Исследования относительной биологической ценности и безвредности молока представлены в таблице 5.

При изучении безвредности проб молока на инфузориях тетрахимена пириформис изменений в структуре и двигательной активности простейших через 1, 2, 4 и 24 часа не установлено, что свидетельствует о безвредности продукта.

Таблица 5 – Определение биологической ценности молока с тетрахи-
мной пириформис

Время отбора проб молока	1-е исследование		2-е исследование		Средние показатели	
	клеток	%	клеток	%	клеток	%
до обработки	356	100,0	372	100,0	364	100,0
после обработки через 12 ч.	348	97,7	360	96,7	354	97,2
24 ч.	358	100,5	364	97,8	361	99,2
36 ч.	370	103,9	374	100,5	372	102,2
48 ч.	372	104,4	380	102,2	376	103,3
72 ч.	358	100,5	384	103,2	371	101,9

Биологическая ценность молока коров через 12 ч после обработки препаратом «Ципервет» в среднем составила 97,2 %, через 24 часа – 99,2 %, через 36 часов – 102,2 %, через 48 часов – 103,3 %, через 72 часа – 101,9 % соответственно по сравнению с молоком коров до обработки этим препара-
том.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1 Проведенные испытания продуктов убоя кроликов после обработки препаратом «Ципервет» свидетельствуют о том, что препарат не оказывает отрицательного влияния на качественные показатели мяса кроликов, кото-
рые согласно вышеуказанным ГОСТам **соответствуют доброкачественно-
му продукту.**

2 Ветеринарный препарат «Ципервет» не оказывает отрицательного влияния на качественные показатели молока коров. **Молоко соответствует доброкачественному продукту, сорт «Экстра».**

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Эктомин фирма «Сиб-Гейги» «Здоровье животных».
- 2 www.superotvet.ru/questions/48478/.
- 3 Наставление по применению препарата Мустанг 100 в.э.
- 4 Биорекс-ГХ – «Завод Ветеринарные препараты» ОАО, Россия, E-mail:
vet@yepre.gus.elcom.ru.
- 5 <http://www.nexz.uz/sipermetvet.html>.
- 6 <http://www.vetlek.ru/directions/>.
- 7 Якубовский М.В., Григорьев Ю.В. и др. Инсекто-акарицидная активность
препарата ветеринарного «Ципервет» и остаточные его количества в продукции
животноводства/Ж. Эпизоотол.,иммунобиол., фармакология, санитария, 2015.–
№ 2.– С.60–67.

УДК 638.1:632.95.024.2

ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕСТИЦИДОВ

Р.С. ПОЛТОРЖИЦКАЯ, М.И. ЧЕРНИК

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского»,
г. Минск, РБ*

Поступила в редакцию 09.07.2015 г.

В период сбора нектара и пыльцы пчелы становятся достаточно уязвимой мишенью при поступлении в биоту пестицидов. Для сведения к минимуму негативного влияния средств защиты растений на пчеловодную отрасль и потери урожаев в растениеводстве от недостатка опылителей в настоящее время все пестициды проходят токсикологическую оценку в отношении медоносных пчел. Интенсивно изучается их влияние на основные биологические и хозяйственные характеристики семей. Несмотря на то, что во всем мире работы по изучению токсического действия пестицидов на полезных насекомых-опылителей получили широкое распространение, исследования экологических защитных механизмов, способствующих предотвращению или сведению к минимуму токсического воздействия на медоносных пчел, находятся на стадии накопления фактов. Общеизвестно, что процесс интоксикации любого живого организма возможен только при условии проникновения в него ядовитого вещества в количествах, достаточных для подавления жизненно важных систем и функций. Самым первым условием для этого является контакт и поступление токсиканта в организм любым из известных путей: через покровы – контактным способом, через органы дыхания – фумигантным и с пищей – трофическим. Именно трофический способ является главным экологическим фактором, определяющим возможность контакта медоносной пчелы с токсикантами, поскольку нектар и пыльца растений являются единственным полноценным для них кормом. В свою очередь растения служат источником питания для многочисленной армии насекомых-вредителей, с которыми возникает необходимость периодически проводить борьбу. Растения при определенных условиях играют роль связующего звена между опылителями и токсикантами, а характер этой связи во многом зависит от абиотических факторов среды – температуры воздуха, влажности, солнечного света, осадков. Многочисленными наблюдениями установлено, что снижение температуры (до 15⁰ С и ниже) и повышенная влажность воздуха приводят к сокращению секреции нектара и уменьшению в нем концентрации сахаров, что делает растения малопривлекательными для посещения их пчелами. Равно как и повышенная (выше 28⁰ С) температура, которая приводит к повышению концентрации сахаров и уменьшению нектаровыделения, создает неблагоприятные условия для деятельности насекомых.

Существенное влияние на активность посещения пчелами растений, обработанных инсектицидом, оказывает применяемый при этом препарат. Защитный механизм насекомых от интоксикации известен, как репеллент-

ный эффект. Репеллентное действие инсектицидов изучалось рядом исследователей [1, 3, 4]. По данным литературы большинство токсикантов обладает выраженной репеллентной активностью. Так, пчелы крайне неохотно потребляют сахарный сироп с примесью гербицидов, а при возможности выбора всегда предпочитают чистый [3]. Отмечена как ольфакторная (пчелы покидают кормушки, не принимая пищи), так и пищевая (вкусовая) репеллентность гербицидов. Показано, что, несмотря на нетоксичность для пчел многих гербицидов, некоторые из них имеют настолько неприятный запах, что контактировавшие с ними пчелы-сборщицы подвергаются атакам других пчел [3, 4].

Как известно, информацию о появлении и местонахождении взятка, его количестве и качестве пчелы-разведчицы получают через систему контактных и дистантных хеморецепторов. Посредством танцев и запахов, адсорбированных покровами тела, добытые сведения они передают остальным пчелам-сборщицам своей семьи. Такой же механизм лежит в основе обнаружения насекомыми корма, содержащего интоксикант. Но при этом инсектицид только при достижении его в определенной концентрации в корме способен вызвать реакцию у пчел, как безусловный химический раздражитель. При содержании в корме инсектицидов ниже уровня разрешающей способности информация пчел-разведчиц мобилизует остальных пчел-сборщиц на сбор и заготовку кормовых запасов. В случаях попадания интоксикантов в корма в количестве, равном уровню реагирования насекомых или же выше этого уровня, в улей от пчел-разведчиц поступает информация о сокращении сбора кормов и даже полном прекращении фуражирования. Исследования, проведенные рядом специалистов [3], свидетельствуют, что концентрация действующего вещества инсектицида, вызывающая отрицательную пищевую реакцию у сборщиц нектара или пыльцы, тесно коррелирует с токсической активностью данного соединения (для медоносной пчелы коэффициент корреляции 0,84, статистически достоверен при $P = 0,01$), таблица 1.

Опытным путем рядом исследователей [3, 4] доказано, что чем токсичнее препарат для опылителей данного вида, тем при меньшем содержании его в корме насекомые реагируют на токсикант, и наоборот. Таким образом, наибольшая вероятность возникновения репеллентного эффекта существует при использовании в целях защиты растений высокотоксичных соединений. Независимо от класса применяемых токсикантов, репеллентный эффект проявлялся при обработке растений такими высокотоксичными для пчел химическими соединениями, как метафос, базудин, циперметрин, децис, независимо от способов поступления их в организм пчел [4].

Таблица 1 – Концентрация инсектицида в корме, вызывающая отрицательную пищевую реакцию насекомых

Инсектицид	СК ₅₀ (%д.в.)	Пороговая концентрация	
		% д.в.	Мг/кг
актеллик	0,0002	0,0003	3,0
базудин	0,0002	0,0004	4,0
волатон	0,0003	0,0006	6,0
гардона	0,0008	0,001	10,0
карбофос	0,0008	0,0009	9,0
метатион	0,0006	0,001	10,0
метафос	0,0001	0,0001	1,0
нексион	0,005	0,009	90,0
фозалон	0,008	0,01	100,0
рогоп	0,005	0,004	40,0
фгалофос	0,006	0,009	90,0
хостаквик	0,0003	0,0005	5,0
хлорофос	0,0003	0,0006	6,0
элсан	0,0004	0,0006	6,0
децис	0,0003	0,0004	4,0
маврик 2Е	0,09	0,02	200,0
каратэ	0,0005	0,0006	6,0
талстар	0,0007	0,0008	8,0
фастак	0,0005	0,0005	5,0
циперметрин	0,0005	0,0005	5,0

На территории РФ разрешено использовать около 700 наименований зарегистрированных пестицидов [2]. Для них установлены уровни предельно допустимого содержания в объектах окружающей среды (вода, воздух, почва), пищевом сырье, продуктах питания и организме человека. Согласно требованиям действующих в России законодательных (Федеральный закон «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения») и норматив-

ных (СанПиН, ГОСТ, ТУ и др.) документов содержание пестицидов в продуктах пчел контролируется. В соответствии с СанПиН 2.3.2.1078–01 и Единым санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору в рамках таможенного союза, предельные уровни содержания пестицидов в продуктах пчел для гексахлорциклогексана, ДДТ и его метаболитов (ДДД и ДДЕ) составляют 0,005 мг/кг. Для альдрина и гептахлора требуется полное их отсутствие и введен нижний предел обнаружения – 0,0002 мг/кг. На концентрацию пестицидов в меде и других продуктах пчел также распространяются требования Гигиенических нормативов 1.2.2701–10. Согласно этому документу максимально допустимый уровень действующего вещества пестицидов в меде следующий, мг/кг: *амитраз* – 0,2, *бромпропилат* – 0,02, *ГХЦ* – 0,005. При этом в СанПиН указано, что наличие других пестицидов в продуктах питания запрещено, но необходимо контролировать их остаточное количество, а также препараты, использовавшиеся при производстве, транспортировке и хранении продовольственного сырья [8].

Из всех существующих групп пестицидов наиболее токсичны для медоносной пчелы инсектициды [3,8,10]. Доказано, что не все препараты этой группы в одинаковой степени губительно действуют на полезных насекомых данного вида. Будучи не схожими по химическому составу и строению молекулы, они существенно различаются по своей физиологической активности [3,11]. Некоторые из них, обладая широким спектром действия против вредных членистоногих, проявляют весьма низкую токсическую активность в отношении медоносной пчелы [3,4,7,11]. Причины данного явления пока не выяснены. И все же подавляющее число инсектицидов проявляет высокую токсичность для пчел, а применение многих из них в мероприятиях защиты растений сопряжено с большой опасностью интоксикации пчел [6].

По степени опасности для пчел пестициды в Беларуси делятся на 4 класса: высокоопасные – P_1 , среднеопасные – P_2 , малоопасные – P_3 и практически неопасные – P_4 . Для них определены экологические регламенты применения с учетом климатических условий, погранично-защитной зоны и ограничения лета пчел.

Для пестицидов, относящихся к классу P_1 – высокоопасные, необходимо соблюдать следующие экологические регламенты:

- обработку растений проводить ранним утром или поздним вечером;
- скорость ветра – до 1–2 м/с;
- погранично-защитная зона для пчел – не менее 4–5 км;
- температура воздуха ниже 15° С;
- ограничение лета пчел – 96–120 часов.

Для пестицидов, относящихся к классу P_2 – среднеопасные, предписано соблюдение следующие экологические регламенты:

- обработку растений проводить ранним утром или поздним вечером;
- скорость ветра – до 2–3 м/с;
- погранично-защитная зона для пчел – не менее 3–4 км;

- температура воздуха ниже 15⁰С;
- ограничение лета пчел – 48–72 часа.

Для класса малоопасных – P_3 и практически неопасных – P_4 для пчел пестицидов экологические регламенты по времени и температуре обработок остаются, как для опасных и среднеопасных; скорость же ветра составляет 4–5 м/с и 5–6м/с; погранично-защитная зона для пчел – не менее 3–4км и 1–2 км; ограничение лета – 24–48 и 6–12 часов, таблица 2.

Таблица 2 – Условия применения пестицидов в соответствии с классом опасности для пчел

Класс	Условные обозначения	Степень опасности	Скорость ветра, м/с	Погранично-защитная зона для пчел, км	Ограничение лета пчел, час
I	P_1	высокоопасные	до 1–2	не менее 4–5	96–120
II	P_2	среднеопасные	до 2–3	не менее 3–4	48–72
III	P_3	малоопасные	до 4–5	не менее 3–4	24–48
IV	P_4	практически неопасные	до 5–6	не менее 1–2	6–12

Примечание – обработку растений препаратами, относящимися к любому из классов, следует проводить ранним утром или поздним вечером при температуре воздуха ниже 15⁰С

Из пестицидов, подлежащих контролю в объектах окружающей среды и продуктах питания, для пчел наиболее токсичны (1–2-й класс опасности) большинство инсектицидов и акарицидов (таблица 3). Гербициды и подавляющая часть фунгицидов для пчел малотоксичны и относятся к 3-му классу опасности, другие соединения из этих групп нетоксичны (4-й класс опасности). Однако ряд фунгицидов на основе действующих веществ хлорокиси меди и цимоксанила – относятся к 1–2-му классу опасности для пчел. Регуляторы роста растений входят в 3 – 4-й класс опасности. Фуролан [действующее вещество 2– (1,3 –диоксоланил-2) фуран] проявляет 2-й класс опасности. У родентицидов, нематодицидов, моллюскоцидов и феромонов классы опасности для пчел не установлены.

На сегодняшний день из 556 наименований средств защиты растений, разрешенных для применения на территории РБ, более 70 относятся к инсектицидам и акарицидам, большинство из которых считаются опасными для пчел, таблица 3.

Таблица 3 – Инсектициды и акарициды, разрешенные для применения в борьбе с фитофагами (на апрель 2011)

Группа по химическому строению	Активно действующее вещество	Наименование препаратов	Класс опасности для пчел
пиретроиды	циперметрин	Арриво, Политрин, Цимбуш*, Циперкилл, Циперон, Циракс, Цитрин*, Циткор, Шарпей, Шерпа	1
	альфа-циперметрин	Альтер, Фастак, Цунами, Роталаз, Фаскорд	1
			2
	бета-циперметрин	Кинмикс	1
	бета-цифлутрин	Бульдок	2
	дельтаметрин	Децис профи, Децис*	2
	бифентрин	Талстар	3
	зета-циперметрин	Тарзан, Фьюри 10EW	1
	гамма-цигалотрин	Вантекс	1
	лямбда-цигалотрин	Каратэ*, Кайзо, Брейк	1
			2
	эсфенвалерат	Суми-альфа, Сэмпай	1
неоникотиноиды	имидаклоприд	Борей (+Лябда-цигалотрин), Варрант, Имидор, Конфидор200, Командор, Конкорд, Проагро100СЛ, Танрек (Биотлин)	1
			1
			3
			3
	индоксакарб	Авант	3
никотиноиды	бенсултап	Банкол*	3
карбаматы	пиримикарб метомил	Пиримикс100, Пиримор Ланнат	3 1
фосфорорганические соединения	хлорпирифос	Нурелл Д (+циперметрин)	1
	диметоат	Би 58 новый, Данадим, Рогор С	1
	малатион	Новактион, Фуфанон	1
	пиримифос-метил	Актеллик	1
	фенитротрион	Сумитион*	2
	фолазон	Золон	2
антраниламида	хлорантранилипрол	Волиам Тарго (+абамектин)	1
	хлорантранилипрол	Кораген	3

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4
акарициды	тебуфенпирад	Масаи	3
	гекситиазокс	Ниссоран*	4
	полисульфиды натрия	ПСК	4
	пропаргит	Омайт	4
	сера	Тиовит Джет	4
ингибиторы синтеза хитина	тефлубензурон	Номолт*	4
	дифлубензурон	Димилин*	4
ингибиторы роста насекомых	феноксикарб	Инсегар	4

Примечание – *препараты, разрешенные для использования остатков в 2010–2011 гг. (без права закупок и ввоза)

Однако следует отметить, что разделение пестицидов по классам опасности носит условный характер и сохраняет свою силу строго при соблюдении условий по их применению.

В 2010 году на территории Дзержинского и Солигорского районов Минской области причиной массовой гибели пчелиных семей оказался инсектицид с активно действующим веществом имидаклоприд, примененный с нарушением инструкции. Картофельные поля находились за большим массивом с цветущими сорными растениями, в непосредственной близости (менее 2-х километров) от населенных пунктов и мест расположения пасек препарат применяли во время активного лета пчел, для опрыскивания использовали вертолет. Экологические регламенты применения данного инсектицида были нарушены: во-первых, санитарный разрыв от мест размещения пасек должен быть не менее 5 километров; во-вторых, согласно «Инструкции по технике безопасности применении пестицидов в сельском хозяйстве» запрещается проводить химические обработки сельскохозяйственных культур в период цветения. Создается впечатление, что агрономы и администрация некоторых хозяйств с инструкциями и экологическими регламентами применяемых для защиты растений препаратами не знакомы. Иначе не поддается объяснению столь равнодушное, даже варварское отношение к беззащитным в этой ситуации пчелам.

Только согласованными действиями специалистов по защите растений, руководителей хозяйств, агрономов, пчеловодов можно уберечь пчел, а также других диких насекомых-опылителей и свести к минимуму экологический риск, связанный с применением пестицидов.

Правительства, неправительственные и международные организации и особенно средства массовой информации должны способствовать осознанию того, что именно пчелы опыляют до 80% растений и что благодаря именно этим «крылатым труженицам» приходится 30% мирового продовольствия и поддерживается биологическое разнообразие на земле.

ВЫВОДЫ

1 Из всех существующих групп пестицидов наиболее токсичны для

медоносной пчелы инсектициды.

3 Из 556 наименований средств защиты растений, разрешенных для применения на территории Беларуси, более 70 относятся к инсектицидам и акарицидам, большинство из которых представляют опасность для пчел.

4 В целях безопасности для пчел применения всех инсектицидов следует неукоснительно соблюдать экологические регламенты. Лучший способ предотвращения потерь пчел и продукции – вывоз пасек на расстояние 5–6 км от места химических обработок на другие медоносы, что легко осуществимо при наличии передвижных платформ.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Алексеницер, М.Л. Токсичность гербицидов для медоносной пчелы/ М.Л. Алексеницер, В.П. Кубайчук, Л.И. Бондарчук // *Сельскохозяйственная биология* –2000. – №6. – С.114–116.
- 2 Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации/ Минсельхоз России. – М., –2010.
- 3 Илларионов, А.И. Экологические механизмы связи медоносной пчелы с обработанными инсектицидами растениями/ А.И. Илларионов // *Агрохимия*. –1995. – №6.
- 4 Илларионов, А.И. Токсическая активность фосфорорганических инсектицидов для медоносной пчелы в зависимости от строения соединений/ А.И. Илларионов // *Агрохимия*. –1992. – №7. – С. 133–137.
- 5 Каталог пестицидов и удобрений, разрешенных для применения в Республике Беларусь: справочное издание. – Минск, ООО «Инфофорум». – 2005.
- 6 Мониторинг пестицидов в объектах природной среды: физико-химические, экологические и токсико-гигиенические характеристики пестицидов (химических средств защиты растений): справочник. – Н. Новгород, 2007. – Ч.1; Обнинск, 2008. – Ч.2.
- 7 Назаров, С.С. Охрана пчел от отравления ядохимикатами/С.С. Назаров// – М., Россельхозиздат. 1967. –244с.
- 8 Пономарев, А. Пчеловодство требует защиты /А. Пономарев, Д. Насонова// *Ветеринария сельскохозяйственных животных*. –2010. – №1. – С.9–12.
- 9 Соловьева Л.Ф. Практические советы / Л.Ф. Соловьева // *Защита и карантин растений*. – 2004. – №5. – С.54– 55.
- 10 Havuar, M. Le fluvalinate appliqué sur pommiers en pleine floraison: contamination des abeilles butineuses et des produits de la ruche/ M. Havuar, L. Kormis, J. Rey// *Agronomie*. – 1990.– V. 10(3).– P.133–137.
- 11 Jeanne,F. Phytopharmacie et apiculture//*Bull. Techn. Apic.*– 1986.–V. 13(4).– P.185–204.

УДК 619:638.154.4-084

**ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНЫЕ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИЕ
СРЕДСТВА В ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНЫХ
МЕРОПРИЯТИЯХ НА ПЧЕЛОПАСЕКАХ**

М.И. ЧЕРНИК, Т.Н. КАМЕНСКАЯ, Р.С. ПОЛТОРЖИЦКАЯ,
С.А. ЛУКЬЯНЧИК, Л.Л. КРИВЕНОК

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского»,
г. Минск, РБ*

Поступила в редакцию 07.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Продуктивность и благополучие пасек обеспечиваются проведением комплекса организационно-хозяйственных и ветеринарно-санитарных мероприятий. Ветеринарно-санитарные мероприятия направлены на предупреждение возникновения болезней на пасеках, быструю ликвидацию имеющихся болезней и контроль за качеством продукции.

Профилактика болезней предусматривает выращивание сильных, здоровых семей с соблюдением общих зоотехнических требований и нормативов, предъявляемых к пчелиным семьям и их содержанию.

Одной из основных мер профилактики является дезинфекция ульев, пчеловодного инвентаря, оборудования, сотов и др.

Дезинфекция – один из основных факторов повышения сопротивляемости заболеванию, если она проводится с профилактической целью и является обязательным элементом при организации лечебных мероприятий по ликвидации уже возникшего заболевания. Без уничтожения возбудителей во внешней среде одними лечебными средствами пасеку оздоровить невозможно, поскольку лечебные препараты действуют, в основном, только на вегетативные формы возбудителей в организме пчел и личинок. Возбудителей и их споры на сотах, в улье, на инвентаре и других предметах уничтожить можно только соответствующими дезрастворами.

Объектами дезинфекции в пчеловодстве являются ульи, соты, инвентарь, оборудование, спецодежда пчеловодов, зимовники, сотохранилища, пчеловодные домики, а также территории пасек (предлетковые площадки), воск (воскосырье).

Дезинфекция объектов пчеловодства имеет свои особенности. Не для всех объектов подходят одинаковые дезинфицирующие средства.

При проведении дезинфекции необходимо учитывать:

- свойства объекта, подлежащего дезинфекции;
- устойчивость патогенных микробов в среде, подлежащей обеззараживанию;
- свойства дезинфицирующих средств и их способность оказывать губительное действие на микробы в той или иной среде и при различных температурных условиях, низкую токсичность, экологическую безопасность, не оказывать коррозионного и разрушающего действия на обрабатываемые объ-

екты.

В пчеловодстве широко применяются следующие дезинфицирующие средства: хлорная известь, однохлористый йод, щелочи (едкий натр и калий, зола, негашеная известь, содо-поташная смесь, кальцинированная сода и др.), кислоты (муравьиная, уксусная), формальдегид, параформ, перекись водорода и др.

На сегодняшний день в мире наметилась тенденция применения экологически безопасных дезинфицирующих средств, которые не загрязняют окружающую среду и безопасны для человека и животных.

Так, препараты на основе перекиси водорода и надкислот (продуктов взаимодействия перекиси и органических кислот) характеризуются экологической безопасностью (отработанные препараты быстро, в течение 3–4 часов, разлагаются на безвредные компоненты, главным образом – кислород и воду).

По мнению зарубежных специалистов, препараты этой группы относятся к дезинфектантам XXI века. Применение пероксидных препаратов с повышенной биоцидной активностью, обладающих коротким временем экспозиции и способностью разлагаться до воды и кислорода, позволяет быстро возвращать оборудование, инвентарь в производственный цикл без дополнительной нейтрализации и мойки, что дает существенный экономический эффект.

Перекись водорода (H_2O_2) обладает универсальным противомикробным действием. К ней чувствительны грамположительные и грамотрицательные бактерии, вирусы, многие виды патогенных грибов. Она вызывает гибель спор большинства спорогенных бактерий. Противомикробное действие препарата связано с его высокой окислительной активностью. Выделяющийся при ее разложении микробными и тканевыми протеазами кислород окисляет сульфгидрильные и гидроксильные группы белков и липидов, вызывая гибель микробов.

Высокая популярность перекиси водорода в медицине как противомикробного средства связана с тем, что она хорошо переносится кожей и слизистыми оболочками, не накапливается в организме при длительном применении, не оказывает токсического и аллергенного действия, проявляет такие дополнительные лечебные эффекты, как механическая очистка места аппликации, дезодорация, стимуляция кровоснабжения и регенерации тканей.

В настоящее время предлагается большой набор дезинфектантов на основе перекиси водорода (оксон, сандим-Д, оксония актив, валисан-2, сандим-Нук, нависан-1, криодез, суперсепт, дезинбак А, септоклин и др.).

Объектами дезинфекции в пчеловодстве являются ульи, соты, инвентарь, оборудование, спецодежда пчеловодов, зимовники, сотохранилища, пчеловодные домики, а также территории пасеки (предлетковые площадки), воск (воскосырье). Дезинфекцию объектов пчеловодства проводят с профилактической целью и вынужденно.

Профилактическую дезинфекцию проводят один раз весной после окончания зимовки пчел. В активный пчеловодный сезон ульи, соты и инвентарь подвергают обеззараживанию перед их использованием для размещения роев, отводков и пакетов пчел, а спецодежду – по мере ее загрязне-

ния.

Перед началом процесса дезинфекции проводят механическую очистку объектов, подлежащих обеззараживанию. Ульи, разделительные и потолочные доски, инвентарь и оборудование очищают от загрязнений и прополиса на бетонированной площадке с навесом и закрытой ямой для сточных вод, удаленной на 200 м от пасеки.

Сухой материал (для предотвращения рассеивания инфекции) предварительно орошают слабым дезинфицирующим раствором или водой. Затем со дна ульев собирают трупы пчел, мусор и сжигают. Очистку осуществляют металлическим скребком, при необходимости промывают ульи горячей водой или при помощи щеток и мочалок.

Пустые соторамки сортируют, очищают от загрязнений и дезинфицируют в недоступном для пчел помещении. Соты для вывода расплода более двух лет использования, а также с черными непросвечивающимися стенками, с заплесневевшей пергой, забродившим медом, сильно загрязненные фекалиями пчел, поврежденные грызунами или неправильно отстроенные, бракуют, складывают в ящики или бочки, плотно утрамбовывают для последующей переработки на воск.

Деревянные планки соторамок, пригодные для дальнейшего использования, тщательно очищают металлическим скребком от загрязнений, воска и прополиса. Территорию пасеки один раз в неделю очищают от травы, мусора, подмора пчел и погибшего расплода, которые собирают и сжигают.

Вынужденную дезинфекцию проводят в соответствии с п.205 – 212 «Ветеринарно-санитарные правила по проведению ветеринарной дезинфекции» (утверждены и введены в действие постановлением Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь №68 от 4 октября 2007г.).

Часть дезинфицирующих средств на основе перекиси водорода уже успешно применяются в ветеринарной и медицинской практике, другие находятся на стадии внедрения. На базе РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» было разработано средство дезинфицирующее «Криокс» ТУ ВУ 600049853.188-2014. Средство внесено в Государственный реестр ветеринарных препаратов, зарегистрированных в Республике Беларусь под № 4744-10-14 БД, срок действия 27.11.14–24.10.19 и средство дезинфицирующее «Пермокс» ТУ ВУ 600049853.101-2011, зарегистрировано в Государственном комитете стандартизации Республики Беларусь за № 032344 от 20.06.2011г. Средство внесено в Государственный реестр ветеринарных препаратов, зарегистрированных в Республике Беларусь под № 3509-10-11 БД, срок действия 20.06.2011–20.06.2016.

В состав обоих препаратов входит перекись водорода, система стабилизаторов, система активаторов и вода. Средство дезинфицирующее «Криокс» имеет ряд преимуществ по сравнению с обычной перекисью водорода, а именно при сочетании компонентов, входящих в состав препарата, наблюдается их синергизм, что позволяет уменьшить концентрации активных веществ, снизить повреждающее действие на материалы и оборудование, уменьшить токсичность. Используемая в средстве система активаторов помимо антимикробных свойств обладает и моющими свойствами.

Средства дезинфицирующие «Криокс» и «Пермокс» обладают анти-микробным, вирулицидным, фунгицидным и протоцидным действием по отношению к группам малоустойчивых (первая группа), устойчивых (вторая группа) и высокоустойчивых (третья группа) возбудителей, активны по отношению к возбудителям, вызывающим болезни пчел (*Melissococcus pluton*, *Bacillus alvei*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus paraalvei*, *Pseudomonas apisepticum*, *Ascosphaera apis*, *Nosema apis*, *Malpighamoeba mellifica*).

Механизм действия средства дезинфицирующего «Криокс» заключается в его высокой окислительной активности. Выделяющийся кислород окисляет сульфгидрильные и гидроксильные группы белков и липидов, вызывая гибель микробов и простейших.

По степени воздействия на организм средство дезинфицирующее «Криокс» относится к умеренно опасным веществам (3 класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76). Рабочие растворы не обладают местно-раздражающим и сенсибилизирующим действием, не вызывают коррозии металлов, не разрушают пластмассы, резину и другие материалы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На экспериментальной пасеке РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» был проведен опыт по дезинфекции ульев и пчеловодного инвентаря препаратами «Пермокс» и «Криокс». Перед началом дезинфекции проводили механическую очистку ульев. Обработку препаратом «Пермокс» проводили 3% раствором из расчета 0,5 л/м² направленным аэрозолем, экспозиция 1ч. Для получения аэрозоля средства дезинфицирующего использовали аэрозольный генератор «Харрикейн» (США) производительность 1–20 л/ч.

После обработки провели контроль качества дезинфекции согласно «Методическим указаниям по контролю качества дезинфекции и санитарной обработке объектов, подлежащих ветеринарно-санитарному надзору» (Минск, 2007). Изучали бактериальную обсемененность поверхностей ульев до обработки и после дезинфекции путем отбора смывов на площади 100 см² в различных точках улья. Определяли общую микробную обсемененность в отобранных смывах, количество кокковой микрофлоры, энтеропатогенных типов кишечной палочки, спорообразующих бактерий методом последовательных разведений с высевом в чашки Петри с дифференциально-диагностическими средами. Посевы инкубировали в термостате при температуре 37° С, учет выросших колоний проводили через 24 – 48 часов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты бактериологических исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1– Микробная обсемененность поверхностей ульев, КОЕ/м²

№ улья	До дезинфекции					После дезинфекции				
	потоло- чина	крыша	вставная доска	дно улья	леток	потоло- чина	крыша	вставная доска	дно улья	леток
1	30 000	7 200	8 800	650 000	9 700	–	–	–	–	–
2	87 200	10800	6 500	820 000	7 500	–	–	–	–	–
3	60 000	5 600	9 200	980 000	8 200	–	–	–	–	–
4	58 500	9 800	8 400	690 000	9 500	–	–	–	–	–
5	44 700	8 700	7 200	75 000	7 900	–	–	–	–	–

Примечание – (–) рост микрофлоры отсутствует

Перед началом дезинфекции препаратом «Криокс» проводили механическую очистку объектов, подлежащих обеззараживанию. Ульи, разделительные и потолочные доски, инвентарь и оборудование очищали от загрязнений и прополиса. Сухой материал (трупы пчел, восковую крошку, мусор) собирали со дна ульев и сжигали. Очистку осуществляли металлическим скребком.

Для изучения исходного количества микроорганизмов были отобраны смывы с объектов, подлежащих обеззараживанию.

Наиболее загрязненными отмечались дно улей и потолочины (количество выросших колоний достигало 910367 ± 15065 КОЕ/см³ и 89400 ± 1300 КОЕ/см³ соответственно). После проведенной дезинфекции криоксом из расчета 0,5 л/м² 3% раствора препарата рост микроорганизмов отсутствовал во всех смывах с обрабатываемых объектов, что свидетельствует о хорошем качестве проведенной дезинфекции.

Общая микробная обсемененность инвентаря и оборудования

представлена в таблице 2.

Таблица 2 – Микробная обсемененность инвентаря и оборудования, КОЕ/см²

№ пробы смыва	До дезинфекции			После дезинфекции		
	медогонка	дымарь	стамеска	медогонка	дымарь	стамеска
1	300	12 667	10 000	–	–	–
2	433	32 666	27 200	–	–	–
3	1 133	90 500	13 500	–	–	–

Проведенные исследования показали, что микробная обсемененность инвентаря и оборудования различная. Наиболее загрязненными являются пчеловодная стамеска и дымарь. После проведенной дезинфекции препаратом «Криокс» в той же концентрации рост санитарно–показательной микрофлоры отсутствовал, что свидетельствует о хорошем качестве проведенной дезинфекции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, средства дезинфицирующие «Пермокс» и «Криокс» рекомендуются для дезинфекции ульев и пчеловодного инвентаря из расчета 0,5 л/м² в виде 3% рабочего раствора при экспозиции 1 час методом орошения и аэрозольно.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Блинов, Н.В. Изыскание новых экологически безопасных средств борьбы с аскоферозом пчел: автореф.дисс... канд.вет.наук/Всерос. НИИ вет. санитарии, гигиены и экологии. – М., 2002. – 24 с.
- 2 Кузнецов, А.Ф. Гигиена содержания животных: справочник/ А.Ф. Кузнецов// 2-е изд. – СПб.: Издательство «Лань», 2004. – С 447–475.
- 3 Баланин В.И. Микроклимат животноводческих зданий/ В.И. Баланин// – СПб.: ПрофиКС, 2003. – 140 с.
- 4 Методические указания по контролю качества дезинфекции и санитарной обработки объектов, подлежащих ветеринарно-санитарному надзору /А.Э. Высоцкий [и др.]// Минск, 2007. – 32 с.
- 5 Плященко, С.И. Повышение естественной резистентности организма осмоя профилактики болезней / С.И. Плященко // Ветеринария. – 1991. – С. 49–52.

Раздел 6. КОРМЛЕНИЕ ЖИВОТНЫХ

УДК 636.2.087.7:636.033

ПРОДУКТИВНОСТЬ И КАЧЕСТВО МЯСА ПРИ ВКЛЮЧЕНИИ В РАЦИОН БЫЧКОВ ГУМАТА НАТРИЯ

В.Ф. РАДЧИКОВ, Е.Ч. ГИРДЗИЕВСКАЯ

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

Поступила в редакцию 10.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Применение в кормлении сельскохозяйственных животных ферментных препаратов позволяет значительно улучшить перевариваемость питательных веществ и, тем самым, повысить их конверсию в продукцию.

Особенно важно использование биологически активных веществ в том случае, когда рационы не соответствуют получению высоких приростов и не сбалансированы по энергии и протеину.

Кормовая база должна обеспечивать эффективное использование поголовья животных, повышение их продуктивности. В последние годы в связи с ростом строительства молочно-товарных и откормочных комплексов в Республике Беларусь потребностью обеспечения полноценного питания и повышения продуктивности животных возросла необходимость увеличения производства кормов и улучшения их качества. Корма, используемые в питании животных, а в некоторых случаях и соотношение их в рационе, не всегда удовлетворяют потребность животных в необходимых питательных веществах. Это в значительной степени сдерживает рост продуктивности животных, снижает эффективность использования кормов, увеличивает затраты на производство единицы продукции. Для решения этой проблемы необходимо изыскивать дополнительные источники кормов и совершенствовать уже существующие с целью повышения эффективности их использования [1, 2, 3].

Применение биологических препаратов способствует существенному изменению обмена веществ, координированию физиологических процессов, активизации защитных реакций в организме животных и, в конечном счете, влиянию на их рост и продуктивность [4, 5, 6]; позволяет поддерживать физиологическое здоровье и снижать риск заболеваний [7, 8].

Целью работы явилось изучение влияния кормовой добавки «Гумат натрия» в составе рационов на мясную продуктивность бычков и качество говядины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для проведения исследований было отобрано четыре группы бычков черно-пестрой породы. В конце научно-хозяйственного опыта проведен контрольный убой 12 бычков, по 3 головы из каждой группы, по методике

ВНИИМС. Бычки каждой группы являлись аналогами по возрасту и живой массе.

В процессе исследований изучены следующие показатели:

- количество заданных кормов и их остатков – методом контрольного кормления;

- химический состав и питательность кормов – путем общего зоотехнического анализа. Отбор проб кормов осуществлялся в начале и конце научно-хозяйственных опытов по ГОСТ 27262-87;

- живая масса бычков – путем взвешивания в начале и конце опыта.

- зоотехническая и экономическая оценка бычков на откорме – при использовании новой кормовой добавки «Гумат натрия»;

- мясную продуктивность – по съёмной и предубойной живой массе, убойной массе и убойному выходу, весу субпродуктов;

- ветеринарно-санитарную и токсико-биологическую оценку продуктов убоя бычков проводили в лаборатории санитарии «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского».

Цифровой материал обработан методом биометрической статистики по Н.Ф. Рокицкому [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для выполнения поставленной цели в ГП «ЖодиноАгроПлемЭлита» Смолевичского района Минской области проведены исследования на молодняке крупного рогатого скота по схеме, представленной в таблице 1.

Таблица 1 – Схема опыта

Группы	Количество животных, голов	Продолжительность опыта, дней	Особенности кормления
I контрольная	15	90	основной рацион (ОР): силос кукурузный, комбикорм КР-3
II опытная	15	90	ОР+ комбикорм КР-3 с включением гумат натрия в дозе 0,3 мл/кг живой массы
III опытная	15	90	ОР+ комбикорм КР-3 с включением гумат натрия в дозе 0,4 мл/кг живой массы
IV опытная	15	90	ОР+ комбикорм КР-3 с включением гумат натрия в дозе 0,5 мл/кг живой массы

В кормовой добавке «Гумат натрия» содержалось 5,8–6,7% сухого вещества, органического – 4,5–4,7%, гуминовых кислот – 38–43%. Величина рН составила 9,7.

Кормовую добавку «Гумат натрия» в количестве 0,3; 0,4 и 0,5 мл/кг живой массы вводили в рацион опытных бычков средней живой массой в

начале опыта 336 кг в возрасте 13 месяцев. Контрольные животные в составе рациона получали комбикорм КР-3 без использования препарата «Гумат натрия».

Анализируя рационы бычков по фактической поедаемости, следует отметить, что у животных всех групп наблюдались небольшие различия в потреблении силоса кукурузного, но эта разница практически не отразилась на питательной ценности рационов.

Среднее потребление сухого вещества оказалось на уровне 10,2–10,9 кг, в 1 кг которого содержалось 1,12–1,17 кормовых единиц.

Продуктивность животных во многом определяется обеспеченностью полноценным протеином. Концентрация обменной энергии в 1 кг сухого вещества составила 10,5–10,7 МДж.

Основным показателем, характеризующим эффективность откорма животных, является живая масса, которая напрямую зависит от количества и качества потребленных кормов.

В наших исследованиях за период откорма использование комбикормов с включением разных доз гумат натрия в составе рационов бычкам опытных групп оказало положительное влияние на энергию их роста (таблица 2).

Таблица 2 – Изменение живой массы и среднесуточные приросты

Показатели	Группы			
	I	II	III	IV
живая масса, кг:				
в начале опыта	331,6±5,29	333,4±3,44	338,1±4,30	340,7±3,81
в конце опыта	423±10,5	427±9,2	434±5,3	439±6,9
валовой прирост, кг	91,4±1,57	93,6±1,79	95,9±2,01	98,3±2,2
среднесуточный прирост, г	1015±7,8	1040±89,3	1065±8,9	1092±8,5
в % к контролю	100	102,5	104,9	107,6

Так, среднесуточный прирост живой массы оказался выше у животных II группы на 25 г или 2,5%, III – на 50 г или 4,9% и IV – на 77 г или на 7,6%, чем у сверстников I группы.

По результатам убоя установлено, что у подопытных животных предубойная масса составила 423–439 кг, причем у бычков опытных групп отмечено увеличение данного показателя на 1,0–3,8%, что, вероятно, связано с более высокими среднесуточными приростами.

Пробы мышц как в контрольной, так и в опытных группах на разрезе

были слегка влажные, не липкие; после надавливания на мясо образовавшаяся ямка быстро выравнивалась, что свидетельствовало об упругой консистенции мяса. Запах поверхностного и глубоких слоев образцов мышц опытных и контрольной групп специфический для данного вида животных (крупный рогатый скот), характерный для свежего мяса, светло-красного цвета. Постороннего запаха во всех пробах не зарегистрировано.

Проба варкой показала, что бульон как в опытных, так и в контрольной группах прозрачный, ароматный, на поверхности бульона жир собирался в виде средних капель, наличие посторонних запахов не зарегистрировано.

При изучении безвредности образцов мяса бычков опытных и контрольной групп на тест-организмах инфузориях тетрахимена пириформис отклонений в морфологической структуре, характере движения, росте и развитии простейших не наблюдалось как в остром опыте через 1, 2, 4, 8 и 24 часа инкубации, так и в хроническом через 96 часов инкубации.

Средние данные по относительной биологической ценности опытных образцов мяса и печени превышали таковые контрольных образцов во 2-й опытной группе – на 1,4 и 1,0 %, 3-й опытной группе – на 2,9 и 3,6 %, 4-й опытной группе – на 2,5 и 2,6 % соответственно.

В результате изучения экономических показателей установлено, что стоимость суточного рациона на 1 голову составляет 8001–8097 рублей. Себестоимость 1 кормовой единицы снизилась с 879 руб. (контроль) до 875 руб. Стоимость кормов на 1 кг прироста уменьшилась с 7883 до 7415 рублей или на 6,3%, а затраты кормов на продукцию – на 1,6 и 5,6% в виду более высоких среднесуточных приростов у молодняка опытных групп (1040–1092 против 1015 в контроле). Себестоимость 1 кг прироста снизилась в опытных группах, получавших гумат натрия, на 1,9, 3,6 и 6% по группам соответственно. Дополнительная прибыль за счет снижения себестоимости прироста в расчете на голову составляла 20405–69526 рублей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1 Скармливание молодняку крупного рогатого скота комбикорма с включением добавки гумат натрия в количестве 0,3–0,5 мл на 1 кг живой массы обеспечивает среднесуточные приросты на уровне 1040–1092 г (контроль – 1015 г).

2 Применение добавки гумат натрия в количестве 0,3–0,5 мл на 1 кг живой массы в рационах бычков позволяет получить дополнительную прибыль от повышения продуктивности и снижения себестоимости прироста в расчете на голову 112,7–354,7 тыс. рублей.

3 Согласно ветеринарно-токсикологической оценке продуктов убоя установлено, что мясо и печень бычков, потреблявших кормовую добавку, является биологически ценным и безвредным.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Радчиков, В.Ф. Новые ферментные препараты в кормлении молодняка крупного рогатого скота: моногр./ В.Ф. Радчиков. – Витебск: ВГАВМ, 2003. – 80 с.
- 2 Глинкова, А.М. Казеиновая кислотная сыворотка в кормлении молодняка крупного рогатого скота: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук / Глинкова А.М. – Жодино, 2013. – 22 с.
- 3 Радчиков, В.Ф. Белково-витаминно-минеральные добавки в кормлении молодняка крупного рогатого скота : моногр./ В.Ф. Радчиков [и др.] // – Жодино, 2010. – 156 с.
- 4 Местные источники энергии и белка в рационах племенных телок/ Н.А. Яцко [и др.] //Ученые записки УО «ВГАВМ».– 2011.– Т. 47,– № 1. – С. 471–474.
- 5 Сахарова-Фетисова, А.Л. Морфологические и биохимические показатели крови у подопытных животных / А.Л. Сахарова-Фетисова // Тезисы докладов между. науч.-практ. конф. – Жодино, 2011. – С. 153–155.
- 6 Радчиков, В.Ф. Эффективность включения новой кормовой добавки из местных источников в рационы молодняка крупного рогатого скота при выращивании на мясо / В.Ф. Радчиков, А.А. Налетько, В.К. Гурин // Зоотехническая наука Беларуси: сб. науч. тр. – Жодино, 2007. – Вып. 41. – С.357–367.
- 7 Радчиков, В.Ф. Комбикорма и белково-витаминно-минеральные добавки для крупного рогатого скота с включением местных источников сырья: моногр. / В.Ф. Радчиков [и др.]. – Витебск: УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», 2006. – 120 с.
- 8 Радчиков, В.Ф. Эффективность использования кормовой добавки на основе торфа в составе комбикорма в рационах молодняка крупного рогатого скота / В.Ф. Радчиков, В.К. Гурин, А.А. Налетько // Зоотехническая наука Беларуси: сб. науч. тр. – Жодино, 2005. – Т. 40. – С.237–242.
- 9 Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий. – М.: Высшая школа, 1973. – 318 с.

УДК 636.2.087.7

ВТОРИЧНЫЕ ПРОДУКТЫ ПРОИЗВОДСТВА САХАРА В КОРМЛЕНИИ ДОЙНЫХ КОРОВ

В.Ф. РАДЧИКОВ, Е.О. ГЛИВАНСКИЙ

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

Поступила в редакцию 10.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Корма играют большую роль не только как основной источник продуктивности животных, но и в значительной степени характеризуют эффективность производства отрасли, так как более 50% затрат ложится на корма.

Важной проблемой скотоводства, обусловленной переводом его на индустриальные ресурсоэффективные технологии, становится создание качественной кормовой базы, включая производство и использование комбикор-

мов. Ведётся поиск дополнительных источников кормовых продуктов, применение которых позволило бы повысить пищевую ценность и биологическую продуктивность комбикормов, а также эффективность их использования в сельском хозяйстве [1, 9].

Сахарная отрасль относится к материалоёмким и энергоёмким видам производства, в которых объём сырья и вспомогательных материалов в несколько раз превышает выход готовой продукции. Благодаря особенностям технологии переработки свеклы свеклосахарное производство является крупным источником образования вторичных сырьевых ресурсов и отходов (свекловичный жом, меласса, фильтрационный осадок (дефекат), рафинадная патока, свекловичный бой и др.) [2, 3].

Производство кормов и добавок для животных на основе отходов переработки сельскохозяйственного сырья и некоторых используемых побочных продуктов промышленности, совершенствование технологий их приготовления на базе новейших научных достижений и передового опыта является актуальной задачей, поскольку безотходная технология даёт возможность дополнительно получить значительное количество ценных кормов для животных. Кроме того, их использование позволит предотвратить загрязнение окружающей среды [4, 5, 8].

В связи с этим целью работы являлось изучение эффективности использования вторичных продуктов в кормлении дойных коров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- изучить химический состав кормов по общепринятым методикам;
- установить поедаемость кормов рациона путем учета заданных кормов и их остатков один раз в декаду в два смежных дня;
- определить морфо-биохимический состав крови приборами Medonic CA-620 и CORMAY LUMEN;
- определить молочную продуктивность путем контрольных доек с определением жира, белка на приборе «Милкоман» один раз в месяц;
- изучить качественные показатели и безвредность молока;
- дать экономическую оценку производства молока при использовании в кормлении коров кормового концентрата.

Материалы исследований обработаны биометрическим методом [6].

Для исследований было отобрано 40 коров черно-пестрой породы с учетом возраста, продуктивности, физиологического состояния и живой массы. Животные были разделены на четыре группы по 10 голов в каждой – контрольную и три опытных.

Согласно схеме кормления контрольная группа получала комбикорм собственного производства, а II, III и IV опытные группы – комбикорм с включением кормового концентрата 15, 20, 25% на основе сушеного жома, мелассы и дефеката кормового взамен зерновой части.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Производство опытных комбикормов осуществлялось в комбикормовом цеху ГП «Жоди́ноАгроПлемЭлита» с использованием собственного сырья.

В опыте использован сушеный свекловичный жом, меласса, дефекат кормовой производства ОАО «Слуцкий сахарорафинадный комбинат».

В 1 кг комбикорма, используемого для коров контрольной группы, содержалось 1,08 корм.ед., 10,9 МДж обменной энергии, 0,87 кг сухого вещества, 164 г сырого протеина, 30,8 г сырого жира, 8,7 г кальция, 9,4 г фосфора. В 1 кг комбикорма для коров II опытной группы с включением кормового концентрата в количестве 15% по массе содержалось 1,04 корм. ед., 10,8 МДж обменной энергии, 0,87 кг сухого вещества, 168,3 г сырого протеина, 33,3 г сырого жира, 10,4 г кальция, 9,09 г фосфора. В комбикормах для коров III и IV опытных групп с включением кормового концентрата в количестве 20 и 25% по массе соответственно содержалось 1,0–0,98 корм.ед., 10,64–10,52 МДж обменной энергии, 0,87 кг сухого вещества, 162–163 г сырого протеина, 28,7–28,1 г сырого жира, кальция 12,0–13,7 г, фосфора 8,9–8,8 г.

Полученные данные свидетельствуют о том, что скормливание дойным коровам кормового концентрата обеспечило следующее потребление кормов: комбикорм – 5,0 кг, дробина пивная – 6,0 кг, сенаж разнотравный – 7,0–7,5 кг, силос кукурузный 6,0–6,5 кг и трава пастбищная 24,6–27,6 кг при их структуре 37,3–40,8%, 30,2–34,1%, 12,7–13,4%, 8,4–9,0%, 37,3–40,8%.

Потребление сухих веществ коровами находилось в пределах 15,0–16,3 кг. В расчете на 1 кормовую единицу во всех группах приходилось 117–120 г переваримого протеина. Сахаро-протеиновое отношение было равно 0,6:0,7. Концентрация обменной энергии в сухом веществе рациона колебалась в пределах 11,7–11,9 МДж. Концентрация клетчатки в сухом веществе при потреблении указанных кормов составила 25,8–26,0. Отношение кальция к фосфору составило 1,64–1,69:1.

Для контроля за физиологическим состоянием животных проводили анализ морфо-биохимического состава крови (таблица 1).

Установлено, что все изучаемые показатели крови, отражающие общее физиологическое состояние организма, находились в пределах физиологических норм во всех группах.

В результате проведенных контрольных доек (таблица 2) установлена среднесуточная продуктивность подопытных коров за опыт, составившая в I контрольной группе 16,4 кг молока жирностью 3,64 %.

Таблица 1 – Морфо-биохимический состав крови коров

Показатели	Группы			
	I	II	III	IV
эритроциты, $10^{12}/л$	5,47±0,2	5,6±0,1	5,7±0,1	5,77±0,2
лейкоциты, $10^9/л$	9,11±0,09	10,3±0,20	10,9±0,31	10,3±0,39
гемоглобин, г/л	95,7±1,4	101,1±1,6	107,2±2,0	112,3±2,3
общий белок, г/л	80,1±2,0	82,7±2,0	83,9±3,1	84,0±4,4
мочевина, ммоль/л	2,99±0,1	3,13±0,2	3,17±0,2	3,22±0,1
глюкоза, ммоль/л	2,95±0,2	3,07±0,3	3,05±0,1	3,07±0,5
кислотная емкость, мг%	483±10,0	497±8,0	510±11,0	518±15,0
кальций, ммоль/л	2,23±0,06	2,33±0,04	2,37±0,05	2,40±0,08
фосфор, ммоль/л	1,54±0,11	1,60±0,14	1,62±0,19	1,70±0,21

Таблица 2 – Молочная продуктивность дойных коров и качество молока

Показатели	Группы			
	I	II	III	IV
среднесуточный удой, кг	16,4±0,32	16,9±0,27	17,1±0,25	17,6±0,29
среднесуточный удой базисной жирности, кг	16,6±0,25	17,4±0,34	17,7±0,43	18,0±0,41
содержание жира, %	3,64±0,02	3,70±0,03	3,72±0,02	3,69±0,03
содержание белка, %	3,15±0,01	3,17±0,02	3,20±0,01	3,23±0,0
среднесуточный удой: ± к контролю, кг	–	0,8	1,1	1,4
%	–	4,8	6,6	8,4
затраты кормов на 1 кг молока, корм. ед.	0,95	0,92	0,91	0,9
к контролю, %	–	3,3	4,4	5,6

При пересчете на 3,6%-ное молоко получено 16,6 кг. Во II группе, получавшей в рационе кормового концентрата 15% по массе, показатель надоя молока в пересчете на 3,6% оказался на 4,8% выше контроля. В III опытной группе, где животные получали 20% кормовой добавки на основе сушеного жома, мелассы и дефекаата кормового, данное значение увеличи-

лось на 6,6% по сравнению с контрольной группой. У молочных коров, получавших 25% кормовой добавки в составе комбикорма (группа IV), среднесуточный надой базисной жирности составил 18,0 кг или 8,4%.

В ходе опытов установлено, что по внешним признакам молоко от коров подопытных групп представляло собой однородную жидкость белого со слегка кремовым оттенком цвета, без осадка и хлопьев. Запах свойственный коровьему молоку, постороннего запаха не выявлено.

Качественные показатели молока коров опытной группы соответствовали молоку сорта «экстра». Так, количество соматических клеток составляло $116\ 666 \pm 15488$ в 1см^3 , плотность молока ($\text{кг}/\text{м}^3$) составила 1028,0, титруемая кислотность (^0T) – $16,3 \pm 0,38$. Постановка реакции на мастит дала отрицательный результат во всех пробах молока.

Ингибирующих веществ во всех исследуемых пробах молока в реакции с тест-культурой стрептококком термофильным не выявлено.

При изучении безвредности проб молока на инфузориях тетрахимена пириформис изменений в структуре и двигательной активности простейших через 1, 2, 4 и 24 часа не установлено, что свидетельствует о безвредности продукта. Биологическая ценность молока опытной группы относительно контрольной группы в среднем по двум опытам составила 108,7 % (таблица 3).

Таблица 3 – Биологическая ценность молока

Группа	1-е исследование		2-е исследование		Средние показатели	
	клеток	%	клеток	%	клеток	%
I (опытная)	51	110,9	49	106,5	50	108,7
II (контроль)	46	100,0	46	100,0	46	100,0

Анализ экономических показателей является заключительным важнейшим этапом исследований, позволяющим предварительно оценить практическую значимость полученных результатов. Можно добиться высоких показателей продуктивности животных, однако если при этом не произойдет снижение себестоимости продукции, то применение разработки на практике приведет только к увеличению выхода валовой продукции, но зато никак не отразится на рентабельности производства.

Расчет экономической эффективности показал, что использование новой кормовой добавки в рационах животных способствует снижению затрат кормов в опытных группах на 3,3–5,5% при незначительном различающемся расходе кормов. Стоимость израсходованных кормов за период

исследований на одно животное в контрольной и опытных группах Составляла 1,54–1,63 млн. бел. руб. Удельный вес кормов в структуре себестоимости молока во всех группах – 41,9%.

В результате исследований установлено, что себестоимость 1 кг молока в контрольной группе составила 1587 бел. руб., во II, III и IV опытных группах она снизилась с 33 до 41 бел. руб. или на 2,1–2,6%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, включение в рационы кормового концентрата в количестве 15, 20, 25% по массе в состав комбикормов взамен зерновой части дойным коровам в основной цикл лактации оказывает положительное влияние на поедаемость кормов, морфо-биохимический состав крови, способствует повышению молочной продуктивности на 4,8–8,4%, жирномолочности – на 0,05–0,08 п.п., а также позволяет снизить затраты на 3,3–5,6% и себестоимость полученной продукции на 2,1–2,6% по сравнению с контрольной группой.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Радчиков, В.Ф. Совершенствование системы полноценного кормления молодняка крупного рогатого скота / В.Ф. Радчиков // Барановичи, 2003. – 192 с.
- 2 Рукишан, Л.В. Перспективы утилизации побочных продуктов переработки свеклы/ Л.В. Рукишан, А.А. Ветошина //Белорусское сельское хозяйство: еж. н-пр. журнал.– 2009. –№9.– С. 54–56.
- 3 Использование и удаление фильтрационного осадка из сахарных заводов: обзорная информ. Вып. 4 / М-во с.-х. Российской Федерации, Агро-НИИТЭИПП. – М., 1992. – 36 с. – (Пищевая промышленность. Сер. 23. Сахарная промышленность).
- 4 Радчиков, В.Ф. Скармливаем жом – деньги бережем / В.Ф. Радчиков, В.П. Цай, В.К. Гурин // Белорусское сельское хозяйство – 2012.– № 2.– С. 58–59.
- 5 Рекомендации по применению кормовой добавки в рационах для ремонтных телок. / В.Ф. Радчиков, В.Н. Куртина, В.П. Цай, В.К. Гурин, А.Н. Кот, Т.Л. Сапсалева, А.М. Глинкова, Г.В. Бесараб / РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству», 2014. Усл.-печ. л. 0,83. Уч.-изд. л. 0,56.
- 6 Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика/ П.Ф. Рокицкий.– Мн.: «Вышэйшая школа», 1973.– 320 с.
- 7 Батанов, С.Д. Состав крови и его связь с молочной продуктивностью у коров/ С.Д. Батанов, О.С. Старостина // Зоотехния, –2005.– № 10.– С.14–17
- 8 Кормовые концентраты в кормлении откормочного молодняка крупного рогатого скота / В.Ф. Радчиков, А.М. Глинкова, В.К. Гурин, В.П. Цай, Т.Л. Сапсалева. // Матеріали Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції «Вклад вчених у розвиток галузі тваринництва» (13–14 листопада 2014 р.)– Полтава, 2014.– С. 40–41
- 9 Лапотко, А. М. Производству комбикормов – новые ориентиры / А.М. Лапотко, А.Л. Зиновенко // Белорусское сельское хозяйство. – 2008.–№ 11(79)–12(80). – С. 40–45.

УДК 636.2.083.37

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВВОДА ПРЕПАРАТОВ
НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ
В КОРМЛЕНИИ МОЛОДНЯКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

М.А. НАДАРИНСКАЯ, А.И. КОЗИНЕЦ, О.Г. ГОЛУШКО, Т.Г. КОЗИНЕЦ

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

Поступила в редакцию 10.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее десятилетие поиск безопасной альтернативы решения проблем предотвращения и лечения желудочно-кишечных расстройств у молодняка в раннем периоде выращивания необходим как превентивная мера против энтеритов, а также профилактики прекращения и лечения диарей.

Интерес к фенольным соединениям обусловлен многими причинами: являясь постоянными компонентами растительных клеток и тканей, выполняют в их составе ряд существенных метаболических, регуляторных и защитных функций, систематически поступают с кормом в организм животных, длительно на него воздействуют. Исследованиями ряда ученых, проведенными на лабораторных животных, установлено положительное влияние биофлавоноидов на слизистую оболочку разных отделов пищеварительного тракта, оказывающих вяжущее действие, сходное с дубильным эффектом, и способствующих образованию тонкого слоя осажденного белка, что умеряет раздражение слизистой. У телят при характерном им кишечном типе пищеварения и глюкозном типе энергообеспечения адаптационная возможность ограничена. Поэтому ученых и практиков занимает проблема сохранения стабильной работы кишечника и корректировка причин и факторов, вызывающих отклонения в его функционировании. Флавоноиды оказывают выраженное влияние также на секреторную и дезинтоксигирующую функцию печени. Они стимулируют секрецию желчи, что является немаловажным моментом, поскольку на патогенные микроорганизмы губительно действует активация секреции желез желудка и кишечника и деконъюгированных солей желчных кислот.

Общепризнанную роль играют бифидобактерии в подавлении гнилостной микрофлоры, активации иммунных процессов, обеспечении защиты от кишечной инфекции, улучшении функционирования кишечника. С течением времени микробный пул кишечника меняется и, как правило, не в пользу бифидобактерий, количество которых может снижаться при истощении организма стрессовыми воздействиями, которые при отсутствии корректирующих мероприятий постепенно угнетаются и гибнут. Одним из таких коррекционных моментов является использование пребиотических препаратов, которые могут в некотором плане поддержать бифидофлору в толстом кишечнике.

Профилактика нарушений функции желудочно-кишечного тракта, вызванных стрессовым воздействием на организм телят, и поддержание на оптимальном уровне кишечного бактериоценоза может быть возможно путем использования препаратов на основе биофлавоноидов растений и пребиотиков.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Апробация добавок на основе растительных экстрактов и пребиотиков в кормлении молодняка крупного рогатого скота в начальном периоде выращивания проводилась в условиях РДУП «ЖодиноАгроПлемЭлита» Смолевичского района Минской области.

Для изучения использования в кормлении телят-молочников изучаемой кормовой добавки «Беби-Спринт» отбирали животных по принципу пар-аналогов в две группы в возрасте с рождения до 3 дней. Продолжительность скормливания изучаемого растительного препарата составила 30 дней. За подопытным поголовьем велось наблюдение в течение пяти последующих месяцев. Опытным телятам выпаивали молозиво и молоко с препаратом в количестве 30 мг на голову в первые 12 дней и 15 мг в последующие 18 дней. Контрольные аналоги получали молочные корма без добавки.

Пребиотическая кормовая добавка «Бэби-Спринт» представляет собой обогатительную смесь с содержанием пребиотика маннанолигосахарида, экстрактов, эфирных масел растений (подорожник яйцевидный, базилик тонкоцветный, куркума длинная, физалис солнечнолистный, манго, индийский крыжовник, чеснок) и микроэлементов в органической форме.

Исследования по изучению эффективности ввода добавки на растительной основе и обогащенной пребиотиками «Вилоцим МБ» проводили на телятах старшего периода выращивания. Для проведения второго научно-хозяйственного опыта отобрали животных в две группы 2,0–2,5 мес. возраста. Телята опытной группы потребляли добавку в составе комбикорма.

«Вилоцим МБ» – кормовая добавка, представляющая собой композицию из экстрактов трав (эвкалипт, базилик тонкоцветный, подорожник яйцевидный, чеснок, манго, индийский крыжовник, жень-шень, *andrographis paniculata*).

В опыте проведен общий зоотехнический анализ кормов по общепринятым методикам. В кормах определены кормовые единицы и обменная энергия – расчетным путем по формулам, влага – по ГОСТ 13496.3-92, сырой протеин – по ГОСТ 13496.4-93 п. 2, сырой жир – по ГОСТ 13496.15-97, зола – по ГОСТ 26226-95 п.1, кальций – по ГОСТ 26570-95 п. 2.1, фосфор – по ГОСТ 26657-97 п. 2.2. Макро- и микроэлементы калий, натрий, магний, железо, цинк, марганец и медь на атомно-абсорбционном спектрофотометре ААС-3; поедаемость кормов рациона – методом учета заданных кормов и их остатков, проведением контрольных кормлений один раз в декаду в два смежных дня; морфологический состав крови – эритроциты, гемоглобин – на ФЭКе; биохимический состав сыворотки крови – общий белок, альбумины, глобулины, мочевины, глюкоза, кальций, фосфор, магний, железо – прибором CORMAV LUMEN; живая масса и среднесуточные приросты – путем индивидуального взвешивания животных в начале и конце исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Успешное выращивание телят в молочный период зависит в значительной степени от их состояния здоровья. Именно в это время организм телёнка попадает в условия, резко отличающиеся от внутриутробных, происходят существенные изменения физиологических процессов, и организм активно адаптируется к новой для него внешней среде. Телятам опытной группы, получавшим добавку в терапевтической дозе, при первых признаках расстройства желудочно-кишечного тракта вводили «Бэби-Спринт» в лечебной дозе один раз или двукратно, и расстройства пищеварения прекращались.

К концу первого месяца интенсивность роста аналогов опытной группы по живому весу превосходила контроль на 8,2%. Разница по живой массе в сравнении с данными при рождении составила 32,1 % в контроле, при 39,1% – в опытной. Разница по среднесуточному приросту составила 24,6% в сравнении с контрольным показателем.

В результате наблюдений за поголовьем в послеопытный период было установлено, что к концу пятого месяца жизни сохранность телят в опытной группе составила 100%, в контрольной – 70%. Начиная с 30-дневного возраста, так и спустя пять месяцев наблюдалась тенденция к превосходству опытных телят по живой массе над контрольными: так, у сверстников II группы она была выше на 1,4% (116,3 кг против 117,9 кг).

При анализе гематологических показателей уровень гемоглобина в крови опытных телят был выше контрольного результата на 7,8%, что указывает на более высокую обеспеченность кислородом опытных животных, а, следовательно, и скорость обменных реакций. Концентрация общего белка в крови телят с повышением стрессовой нагрузки увеличивается, как адаптивно-мобилизационный ответ защитной реакции. В крови опытных животных уровень общего белка зафиксирован ниже контрольного показателя на 4%.

Напряженность иммунного ответа контрольных телят можно проследить по уровню глобулинов в сыворотке крови, количество которых через месяц было выше, чем у опытных на 23% ($P < 0,05$). Уровень транспортных белков крови альбуминов в сыворотке опытных аналогов было выше контрольного показателя на 3,5%. Все аспекты указывают на то, что организм контрольных телят находился в состоянии иммуносупрессии и адаптационной защиты, мобилизующей все системы организма на его стабилизацию.

Противовес стрессовым воздействиям в организме телят вызывает расход энергетических веществ. В организме телят эту роль выполняет глюкоза, концентрация которой в крови опытных аналогов была выше на 24%, что свидетельствует о высоком расходе этого энергоресурса организма.

Липидный обмен в организме телят можно идентифицировать по количеству холестерина в крови животных. Активность метаболизма жиров в организме телят опытной группы после месячного скармливания препарата была выше, чем у контрольных аналогов, о чем свидетельствует более высокая концентрация в сыворотке крови холестерина, разница составила 28,5%. Отмечено, что в крови контрольных аналогов уровень холестерина был в нормативных пределах, что говорит о гомеостатической стабильно-

сти жирового обмена и более выгодных предпосылках роста для аналогов опытной группы.

Количество креатинина, продукта белкового обмена, который может быть депонирован в мышцах в виде креатинфосфата и использован как энергетический материал в случае необходимости для синтетических образований в крови опытных аналогов было выше на 15%, чем в образцах у контрольных телят.

Важным аспектом идентификации хорошей работы печени является уровень билирубина в сыворотке крови молодняка крупного рогатого скота. В пробах сыворотки опытных телят его содержание было ниже контрольного результата на 28,3% ($P < 0,05$).

В наших исследованиях количество кальция и фосфора у телят, получавших добавку с биофлавоноидами, было выше относительно контроля на 8,2 и 6,7% соответственно.

Во втором научно-хозяйственном опыте в структуре рационов подопытных групп сочные корма занимали 8,9 и 9,7%, концентраты – 47,1 и 48,7%, ЗЦМ – 21,1 и 19,9% соответственно. Энергетическая питательность рационов находилась в пределах 9,9 – 9,8 МДж обменной энергии в 1 кг сухого вещества. Содержание сырого протеина в 1 кг сухого вещества было на уровне 142,5–139,6 г. В среднем в рационе за период исследований содержание переваримого протеина на 1 к.ед. по группам составляло 89,3–88,7 г, количество клетчатки было в пределах нормы (16,4–15,9%), сахаро-протеиновое отношение было на уровне – 0,77–0,74:1. Кальций-фосфорное соотношение в рационе молодняка обеих групп составляло 1,2:1.

Динамика живой массы подопытных телят свидетельствует о положительном вводе кормовой добавки «Вилоцим МБ». Так, живая масса молодняка контрольной группы, получавшего рацион хозяйства, к концу периода исследований была ниже сверстников на 4,8%. Среднесуточный прирост опытной группы превосходил контрольные аналоги на 8%. Это можно объяснить скормливанием добавки, в состав которой входили экстракты лекарственных трав, содержащие горечи, фитонциды, эфирные масла – тимол, эвгенол и т.д., способствующие возбуждению аппетита.

Биохимический анализ крови подопытного молодняка характеризует эффективность ввода испытуемого препарата на метаболический профиль организма телят. Анализ общего состояния биохимических показателей крови по истечении трёхмесячного срока выращивания характеризовался небольшой протеинемией у контрольных аналогов, разница составила 12,7% в сравнении с физиологическим нормативом (70 г/л). Тогда как у опытных телят норматив был превышен всего лишь на 5,6%. Доля альбуминов в крови телят контрольной группы составляла 55,5%, глобулинов – 44,5; опытной, соответственно, – 46,0 и 54,0%.

Уровень мочевины, конечного продукта азотистого обмена, в крови растущего молодняка находился в пределах ориентировочного норматива (1,0–6,0 ммоль/л). Однако у телят контрольной группы этот показатель был ниже опытного результата на 10%, что указывает на повышение ее образования в печени.

Основным показателем метаболизма углеводов служит концентрация сахара в крови. Некоторое превышение биохимического норматива по глю-

козе (2,4–5,5 ммоль/л) наблюдалось в обеих группах, наиболее характерно для интенсивно растущего молодняка. Однако расход этого энергетического субстрата увеличивается при интенсификации метаболических процессов и превращений. У опытных аналогов концентрация глюкозы было ниже контрольного результата на 16,6%.

О повышении расхода питательных веществ организмом на полезные цели свидетельствует уменьшение уровня холестерина, тем самым обуславливая улучшение функционирования печени животных. Концентрация холестерина у контрольных телят превышала верхнюю границу норматива (0,18–2,09 ммоль/л) на 14,8%, в опытной же этот показатель был в ее пределах, что указывает на улучшение метаболических процессов в организме.

Расчет экономической эффективности скармливания добавки «Вилоцим МБ» показал, что в структуре стоимости комбикорма новая кормовая добавка «Вилоцим МБ» составляла 0,4%. Общие затраты на производство валового прироста в опытной группе составили 726,9 тыс. руб., однако это не отразилось на себестоимости 1 кг прироста, которая была ниже, чем в контроле на 609 рублей. Расход кормовых единиц на 1 кг прироста в контрольной группе составил 3,85, или на 0,09 больше в сравнении с опытной группой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Скармливание молодняку крупного рогатого скота с рождения и до 30-дневного возраста пребиотической кормовой добавки «Бэби-Спринт» способствует повышению сохранности животных, продуктивности на 24,6% при окупаемости затрат на приобретение кормовой добавки в расчёте на 1 руб. 5 рублей.

Использование в составе комбикормов для молодняка крупного рогатого скота кормовой добавки «Вилоцим МБ» способствует повышению продуктивности животных на 8,0%, снижению себестоимости прироста на 6,1% и получению дополнительной прибыли в размере 47,2 тыс. руб. на 1 голову.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Емельяненко, П. А. Иммунная система жвачных / П. А. Емельяненко // *Проблемы ветеринарной иммунологии*. – М. : ВАСХНИЛ, 1985. – С. 40–46.
- 2 Карпуть, И. М. Иммунология и иммунопатология болезней молодняка / И. М. Карпуть. – Мн. : Ураджай, 1983. – 250 с.
- 3 Терехов, В. И. Проблемы острых кишечных болезней молодняка сельскохозяйственных животных и их решения / В. И. Терехов // *Актуальные проблемы молодняка в современных условиях : сб. науч. тр.* – Воронеж, 2002. – С. 48–51.
- 4 Меры борьбы с диарейми новорождённых телят / В. А. Мищенко [и др.] // *Ветеринария*. – 2002. – № 4. – С. 16–19.
- 5 Борознов, С. Л. Использование пробиотиков и пребиотиков в лечении и профилактике болезней телят / С. Л. Борознов // *Учёные записки Витебской государственной академии ветеринарной медицины*. – 2008. – Т. 44, вып. 1. – С. 69–73.
- 6 Авакьянц, Б. М. Сравнительная оценка различных методов лечения диспепсии телят / Б. М. Авакьянц, А. В. Коробов, А. И. Шретер // *Новое в диагностике, лечении и профилактике болезней животных*. – М., 1996. – С. 31–33.
- 7 Барабой, В. А. Биологическое действие растительных фенольных соедине-

ний / В. А. Барабой. – Киев : Наукова думка, 1976. – 250 с.

УДК 636.2.085.16

**«ВАМИ-ЛАКТУЛОЗА» – ДОБАВКА С ПРЕБИОТИЧЕСКИМИ
СВОЙСТВАМИ ДЛЯ МОЛОДНЯКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

А.И. КОЗИНЕЦ, О.Г. ГОЛУШКО, Т.Г. КОЗИНЕЦ, М.А. НАДАРИНСКАЯ

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

Поступила в редакцию 10.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время высокий уровень заболеваемости молодняка сельскохозяйственных животных, связанный с нарушением нормального микробиоценоза пищеварительного тракта, является важнейшей проблемой современного промышленного животноводства. Резкое уменьшение нормальной кишечной микрофлоры оказывает отрицательное влияние на пищеварение, инактивацию продуктов метаболизма, что приводит к снижению иммунитета организма животных. Введение молодняку в составе комбикорма ростовых факторов (пребиотиков) для стимуляции активности бифидобактерий в толстом отделе кишечника резко снижает распространение дисбактериозов и падеж животных от кишечных инфекций. Одним из известней-

ших уже более полувека пребиотиков является лактулоза.

Лактулоза – это продукт глубокой переработки молока – синтетический дисахарид, не встречающийся в природе, состоит из двух молекул, соединенных β -гликозидной связью. Попадая в толстый кишечник, она служит питательным субстратом для сахаролитических бактерий (лишь около 0,25–2,0% всасывается в неизменном виде в тонкой кишке). В настоящее время доказана безопасность и эффективность применения лактулозы при многих заболеваниях желудочно-кишечного тракта, печени и других органов, связанных с дисбактериозом [1, 2].

В последние годы получило развитие новое направление в кормопроизводстве – создание кормовых добавок нового поколения с функциональными свойствами. Добавки с функциональными свойствами – это продукты специального назначения естественного или искусственного происхождения, которые предназначены для систематического ежедневного употребления и направлены на восполнение недостатка в организме энергетических, пластических и регуляторных питательных субстратов. Оказывая регулирующее действие на физиологические функции и биохимические реакции, подобные кормовые средства поддерживают состояние здоровья животных и снижают риск возникновения заболеваний, в том числе вызванных нарушением микробного биоценоза пищеварительного тракта [3, 4]. Современные способы создания кормовых добавок функционального назначения для сельскохозяйственных животных предполагают комбинированное воздействие физических, химических и биологических факторов (в т.ч. технологическое введение лактулозы в рационы). Жидкий концентрат лактулозы намного сложнее использовать в промышленном кормлении. Поэтому представляет большую значимость и актуальность разработка добавок на ее основе, как и рациональных способов введения концентрата в комбикорма для более подверженных таким расстройствам группе сельскохозяйственных животных, как молодняк крупного рогатого скота с целью стимулирования иммунной защиты организма животных и повышения их продуктивности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

С целью изучения возможности коррекции биоценоза кишечника молодняка крупного рогатого скота с применением пребиотиков была разработана сотрудниками опытно-экспериментальной научно-производственной лаборатории кормовых добавок и биопродуктов РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству» новая лактулозо-содержащая кормовая добавка комплексного действия «ВАМИ-лактүлоза». Новая добавка с пребиотическими свойствами была изготовлена на основе трепела месторождения «Стальное» Хотимского района Могилевской области с включением концентрата лактулозы и солей микроэлементов. Исследования по изучению эффективности ее скармливания велись в условиях РДУП «ЖодиноАгро ПлемЭлита» Смолевичского района Минской области на молодняке крупного рогатого скота.

Были отобраны телята для опыта со средней живой массой 75 кг в двухмесячном возрасте в три группы по 10 голов. Две опытные (II, III) и

контрольная (I). Новую пребиотическую добавку «ВАМИ-Лактулоза» вводили в состав комбикорма в количестве 1 и 2% по массе и скармливали животным в течение двух месяцев.

Для отслеживания изменений за состоянием здоровья проводили биохимические исследования крови, образцы которой отбирали от 4 голов каждой группы за 2,0–2,5 часа до кормления из яремной вены.

В опыте проведен общий зоотехнический анализ кормов по общепринятым методикам. В кормах определены кормовые единицы и обменная энергия – расчетным путем по формулам, влага – по ГОСТ 13496.3-92, сырой протеин – по ГОСТ 13496.4-93 п. 2, сырой жир – по ГОСТ 13496.15-97, зола – по ГОСТ 26226-95 п.1, кальций – по ГОСТ 26570-95 п. 2.1., фосфор – по ГОСТ 26657-97 п. 2.2.; поедаемость кормов рациона – методом учета заданных кормов и их остатков, проведением контрольных кормлений один раз в декаду в два смежных дня; морфологический состав крови – эритроциты, гемоглобин – на ФЭКе; биохимический состав сыворотки крови – общий белок, альбумины, глобулины, мочевины, глюкоза – прибором CORMAV LUMEN; живая масса и среднесуточные приросты – путем индивидуального взвешивания животных в начале и конце исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При полном удовлетворении потребностей телят в основных питательных и биологически активных веществах весьма важным является уровень их усвоения организмом животного. Ввод пребиотической добавки в состав комбикорма для телят при практически одинаковом потреблении кормов способствовал лучшему усвоению поступивших с кормом питательных веществ. Свидетельством этому являются показатели валового прироста живой массы молодняка. Было установлено, что с использованием кормовой добавки с пребиотическими свойствами в рационах телят в количестве 1% по массе к 4-месячному возрасту живая масса увеличилась на 1,4%, у животных, получавших с комбикормом 2% добавки – на 2,9% по сравнению с контрольными аналогами. Валовый прирост за период опыта у телят II группы в сравнении с контролем был больше на 1,5 кг, или 2,7%, III группы – на 3,8 кг, или на 6,9%.

За время скармливания испытуемого препарата в дозе 1% среднесуточный прирост живой массы телят в среднем оказался выше на 3,3%, тогда как с увеличением уровня ввода новой добавки до 2% по массе – на 7,8% по сравнению со сверстниками, не поедавшими пребиотик с комбикормом (таблица 1).

Таблица 1 – Динамика прироста живой массы телят

Группа	Живая масса, кг		Валовый прирост, кг	Среднесуточный прирост	
	в начале опыта	в конце опыта		кг	% к контролю
I-контрольная	75,0±1,81	130,1±5,13	55,1±4,89	0,900±0,08	100,0
II-опытная	75,3±2,15	131,9±3,93	56,6±3,68	0,930±0,06	103,3
III-опытная	75,0±1,86	133,9±3,74	58,9±3,30	0,970±0,05	107,7

Немаловажное значение имеет изучение показателей крови, поскольку позволяет определить физиологическое состояние, направленность и динамику обменных процессов в организме животных. Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что показатели большинства метаболитов находились в пределах биологической нормы и лишь некоторые из них отклонялись за допустимые пределы в ту или иную сторону (таблица 2).

Таблица 2 – Биохимические показатели крови телят

Показатели	Группа		
	I контрольная	II опытная	III опытная
до скармливания добавки			
общий белок, г/л	64,1±3,51	61,4±2,55	59,5±2,13
альбумины, г/л	39,3±7,73	35,4±1,36	36,8±1,42
глобулины, г/л	24,8±7,59	26,0±2,53	22,7±1,66
мочевина, ммоль/л	5,8±0,78	3,6±0,33*	3,4±0,95
глюкоза, ммоль/л	2,2±0,19	3,5±0,38*	3,9±0,28**
билирубин, ммоль/л	1,7±0,17	1,3±0,22	1,7±0,25
холестерин, ммоль/л	1,5±0,28	1,9±0,23	1,4±0,11
после скармливания добавки			
общий белок, г/л	72,1±3,46	68,6±1,45	65,6±2,16
альбумины, г/л	33,8±4,06	32,5±3,57	30,5±2,03
глобулины, г/л	38,2±2,43	35,9±4,79	35,0±4,15
мочевина, ммоль/л	5,6±0,38	6,4±0,99	6,5±0,12
глюкоза, ммоль/л	3,5±0,37	3,9±0,25	3,8±0,34
билирубин, ммоль/л	0,8±0,15	1,4±0,11*	1,2±0,14
холестерин, ммоль/л	1,5±0,24	1,6±0,16	2,0±0,20

Примечание – здесь и далее достоверно при * $P<0,05$, ** $P<0,01$ в сравнении с контролем

Установлено, что содержание общего белка, первого показателя увеличения темпов образования белка тела, у подопытных телят к окончанию скормливания добавки увеличилось по сравнению с началом опыта. В I группе это увеличение составило 12,5%, во II и III опытных группах – 11,7 и 10,3% соответственно. Снижение показателя протеина крови демонстрирует активное построение белка тела в организме опытных животных.

Для соотношения белковых фракций было характерно снижение альбуминов к концу опыта и увеличение глобулинов у телят всех групп, что связано с возрастными изменениями. Известно, что высокие показатели глобулиновой фракции в крови, как правило, сопровождаются большой устойчивостью животных к воздействию неблагоприятных факторов внешней среды [5]. Однако повышение адаптационных способностей организма путем улучшения неспецифических факторов резистентности корректирует выработку глобулинов в организме телят. Уровень глобулиновой фракции к концу скормливания в сравнении с начальными величинами возрос на 54,0% в контроле, во II опытной – на 38,0% и в III опытной – на 54,2%.

Исходные данные по концентрации мочевины свидетельствуют о том, что в крови опытных аналогов наблюдалось пониженное ее содержание. Поскольку мочевина – конечный продукт метаболизма белков, уменьшение ее концентрации в сыворотке указывает на снижение интенсивности протеинового обмена. Показатели этого метаболита в сыворотке крови опытных телят II и III групп были меньше на 38,0% и 41,4% соответственно по сравнению с контролем. К концу скормливания добавки уровень мочевины увеличился в сыворотке крови аналогов II группы в 1,7 раза, III группы – в 1,9 раза по сравнению с начальными величинами. Исследование концентрации мочевины показало превышение ее в сыворотке крови опытных телят во II и III группах в пределах физиологической нормы на 14,3% и 16,1% при сопоставлении с контрольными сверстниками. Данный метаболит, относящийся к низкомолекулярным антиоксидантам неферментативного звена антиоксидантной системы, играет важную роль в иммунной защите организма и поддержании его гомеостаза.

Содержание билирубина, относящегося, как и мочевина к низкомолекулярным антиоксидантам, в конце исследований было выше в сыворотке крови опытных аналогов обеих групп в среднем в 1,6 раза по сравнению с контролем. Таким образом, добавка «ВАМИ-Лактулоза» оказала в определенной степени положительное влияние на антиоксидантную систему организма телят.

В отношении глюкозы нужно отметить, что в начале исследований она находилась в крови контрольных телят у нижней границы норматива, у опытных аналогов, наоборот, – у верхней границы. По данному показателю последние достоверно превосходили контрольных животных. В конце скормливания добавки с пребиотиком концентрация глюкозы у подопытных телят всех групп находилась у верхней границы норматива. Через два месяца скормливания добавки «ВАМИ-Лактулоза» содержание сахара в крови телят опытных групп было на 11,4% и 8,6% выше по сравнению с контролем. Следует отметить, что активизация функционирования симбиотной микрофлоры способствует синтезу органических кислот, спиртов,

липидов, витаминов, всасываясь в кровеносное русло, которые участвуют в энергетическом и витаминном обменах.

Неоспоримый интерес к важному этапу решения эффективности скормливания пребиотической добавки состоит в том, насколько экономически окупилось ее использование в рационах молодняка крупного рогатого скота.

Расчеты показали, что введение в рацион телят добавки с пребиотическими свойствами в количестве 1 и 2% по массе снизило затраты кормов на 1 кг прироста живой массы по сравнению с таковыми у контрольных животных на 2,3% и 7,0%. Себестоимость 1 кг прироста в опытных группах была ниже на 1,2 и 3,7%, чем в контроле. В расчете на 1 руб. затрат была получена прибыль при скормливании 1% пребиотической добавки 2,6 руб., при дозировке 2% – 3,3 руб.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Скормливание пребиотической кормовой добавки комплексного действия молодняку крупного рогатого скота до 6-месячного возраста обеспечивает получение среднесуточных приростов живой массы животных на 930–970 г, способствует увеличению концентрации в крови низкомолекулярных антиоксидантов (мочевина, билирубин) в пределах физиологической нормы и снижает себестоимость продукции на 1,2 и 3,7%.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Храмцов, А. Г. Олигосахариды – пребиотики из лактозы молочного сырья, их функциональное назначение и некоторые свойства лактулозы / А. Г. Храмцов, С. А. Рябцева, Д. О. Мячина // science.ncstu.ru/articles/food/2006_2/04.pdf/file_download.
- 2 Храмцов, А. Г. Биотрансформация лактозы в лактулозу / А. Г. Храмцов, С.А. Рябцева, В. К. Топалов // Сборник научных трудов СевКавГТУ. Серия «Продовольствие». – 2007. – № 3. – Режим доступа: www.ncstu.ru.
- 3 Бейоп, Е. А. Дисбактериозы кишечника и их клиническое значение / Е. А. Бейоп, И. Б. Куваева // Клин. мед. – 1986. – С. 37–44.
- 4 Храмцов, А. Г. Технология кормовых добавок нового поколения из вторичного молочного сырья / А. Г. Храмцов. – М. : ДеЛи принт, 2006. – 328 с.
- 5 Лактоза и ее производные / Б. М. Синельников [и др.]; науч. ред. акад. РАСХН А.Г. Храмцов. – СПб : Профессия, 2007. – С. 582–602.
- 6 Сахарова-Фетисова, А. Л. Морфологические и биохимические показатели крови у подопытных животных / А. Л. Сахарова-Фетисова // Тезисы докладов Международной научно-практической конференции. – Жодио, 2011. – С. 153–155.

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ
ПРЕПАРАТОВ В РАЦИОНАХ КОРМЛЕНИЯ ТЕЛЯТ
МОЛОЧНОГО ПЕРИОДА**

В.И. ЕРЕМЕЦ¹, Е.Э. ШКОЛЬНИКОВ¹, И.В. ПАВЛЕНКО¹,
Н.К. ЕРЕМЕЦ¹, П.А. КРАСОЧКО²

¹ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический
институт биологической промышленности», г. Щелково, РФ
²РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского»,
г. Минск, РБ

Поступила в редакцию 10.07.2015 г.

Залогом успешного развития животноводства и птицеводства на современном этапе является увеличение поголовья, использование максимально продуктивных пород животных, кроссов птиц и интенсивных технологий выращивания. Однако это приводит к значительному усилению техногенной и микробиологической нагрузки на организм животных и птиц.

В сложившейся ситуации необходимо качественное изменение характера кормовой базы за счет создания и применения экологически безопасных и эффективных биологически активных кормовых добавок, обладающих высокой питательной ценностью, что, в конечном счете, обуславливает интенсивное развитие такого направления экобиотехнологии, как разработка и использование в животноводстве пробиотиков, симбиотиков, синбиотиков и др. (1, 2).

Экологически безопасные ростстимулирующие препараты при малых расходах физиологичны по своему действию, безвредны для животных, технологичны в производстве и применении. Их можно производить по унифицированным технологиям на гибких технологических линиях, размещенных в непосредственной близости к потребителю, на модульных био заводах, агропредприятиях и животноводческих комплексах (3, 4).

В настоящее время во многих странах при кормлении продуктивных животных и птицы используют синтетический лизин (моногидрохлорид лизина). Синтетический лизин, кроме его дороговизны и импортного производства, оказывает негативное воздействие на качество получаемой мясной продукции и на окружающую среду. Для устранения недостатка лизина в рационах животных и птиц целесообразно использовать лизинсодержащие компоненты корма (5).

Симбиотики – продукты биотехнологического производства, содержащие живые микроорганизмы, которые продуцируют в желудочно-кишечном тракте животных и птиц аминокислоты (в том числе незаменимые), ферменты, витамины и, таким образом, способствуют повышению продуктивности.

Одним из важнейших многочисленных обитателей кишечника является кишечная палочка *Escherichia coli*. Доказана возможность сознательного приживления сконструированных штаммов *E.coli* (продуцентов биологически активных соединений) в желудочно-кишечном тракте животных и птиц

на определенный промежуток времени.

Во ВНИТИБП проведен комплекс исследований по разработке технологии производства нового симбиотического препарата, получаемого методом управляемого глубинного культивирования и сублимационно высушенной культуры штамма *E.coli*, полученного из коллекции ВКПМ.

В молочный период кормления телят происходит функциональная перестройка органов пищеварения, начинает вырабатываться способность усваивать питательные вещества растительных кормов, усиливается белковый, минеральный и водный обмен.

Потребность в питательных веществах и энергии возрастает за счет молока матерей и удовлетворяется не полностью. Этот период характеризуется одновременно интенсивным ростом органов и тканей, способностью молодых животных давать высокие приросты. Особенностью этого периода является постепенный переход от молочного типа питания к растительному, при этом кишечный тип пищеварения заменяется желудочно-кишечным, свойственным взрослым жвачным животным.

Среди незаменимых аминокислот особенно необходимых растущему организму, лизин занимает особое место. Он входит в состав структурных тканевых белков и белковых ферментов, способствует улучшению пищеварения и снижению желудочно-кишечных заболеваний, играет важную роль в формировании костяка, повышении продуктивности.

Альтернативным подходом к решению проблемы восполнения дефицита незаменимой аминокислоты (лизина) в рационах кормления телят на доращивании может стать использование симбиотического препарата, который синтезирует достаточное количество необходимого для организма лизина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Симбиотический препарат получают, используя штаммы бактерий-продуцентов незаменимых аминокислот. Изготовление препарата производится в процессе периодического управляемого глубинного культивирования в питательной среде на основе перевара Хоттингера. Полученную культуру концентрируют, бактериальную массу ресуспендируют в защитной среде и лиофильно высушивают для длительного сохранения биологических свойств симбиотического препарата (6).

Целью исследования является изучение влияния применения симбиотического препарата на основе штамма *E. coli* VL-613, обладающего способностью продуцировать в желудочно-кишечном тракте молодых животных лизин и позволяющего повысить привесы и сохранность телят, снизить себестоимости продукции на 1 кг привеса. Применение препарата позволяет максимально сбалансировать рацион телят по незаменимой аминокислоте – лизину, нормализовать микробиоценоз кишечника, что в свою очередь ведет к лучшему усвоению кормов и их компонентов, снижению заболеваемости молодняка и экономии лекарственных средств.

Эта цель достигается за счет того, что в полноценный рацион телят вносят симбиотический препарат из расчета 300 млн. микробных клеток препарата (1 доза) на одного теленка каждый день с 20-го по 60-й день выращивания (патент RU № 2516787 «Способ кормления телят с 20-го по 60-й

день выращивания», опубликован 20.05.2014).

Симбиотический препарат применяют путем равномерного внесения его в утреннюю порцию корма, предназначенного для телят.

При использовании рекомендованных доз симбиотического препарата осложнений и побочного действия его не обнаружено. Противопоказания для применения симбиотического препарата не выявлены.

Для определения эффективности применения в рационе кормления телят симбиотического препарата был проведен опыт на телятах с 20-го по 60-й день выращивания.

В опытах находилось две группы телят. Основной рацион кормления для обеих групп был одинаков.

Контрольная группа телят (62 головы) получала полноценный для данной возрастной группы основной рацион. Для телят опытной группы (65 голов) корм основного рациона обогащали симбиотическим препаратом.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Приводим результаты лечебно-профилактического эффекта от применения симбиотического препарата при внедрении его в корм телятам (таблица 1).

Таблица 1– Лечебно-профилактический эффект от применения симбиотического препарата телятам

Показатели	Контрольная группа	Опытная группа
количество животных в группе (голов)	62	65
продолжительность опыта (дней)	33	33
заболеваемость телят (голов)	14	5
заболеваемость телят от количества животных в группе (%)	22,58	7,69
затрачено средств на лечение группы (руб.)	44 411,22	7 798,66
затрачено средств на лечение, на 1 голову (руб.)	716,31	119,97
сохранность (%)	100	100

Примечание – контрольная группа – выращивание телят на основном рационе; опытная группа – выращивание телят на основном рационе с добавлением симбиотического препарата

Как видно из таблицы 1 заболеваемость телят опытной группы ниже, чем контрольной в 2,93 раза, затрачено средств на лечение телят опытной группы в 5,69 раза меньше, чем контрольной.

Таблица 2 – Расчет экономического эффекта от применения симбиотика

Показатели	Контрольная группа	Опытная группа
количество животных в группе (голов)	62	65
продолжительность опыта (дней)	33	33
средняя масса одной головы в начале производственной проверки (кг)	61,8	62,8
масса группы в начале производственной проверки (кг)	3831	4038
средняя масса одной головы в конце производственной проверки (кг)	82,5	88,4
масса группы в конце производственной проверки (кг)	5114	5745
привес среднесуточный (г)	627	796
валовый прирост за период скармливания (кг)	1283	1707
расходы на 1 кг привеса (корма, заработная плата персонала, транспорт и т.д.) (руб.)	60,98	60,98
количество дополнительной продукции (кг)	–	424
стоимость полученной продукции (руб.)	78 231,71	104 085,37
стоимость симбиотика (1 доза/руб.)	–	0,89
количество симбиотика за период производственной на группу (доз.)	–	2145
стоимость симбиотика за период производственной на группу (руб.)	–	1909,05
стоимость симбиотика за период производственной на голову (руб.)	–	29,37
итого расходов на валовый прирост за период скармливания (руб.)	122 642,93	113 793,08
себестоимость 1 кг привеса (руб.)	95,59	66,66
дополнительная прибыль на группу (руб.)		12 266,32
экономический эффект на 1 голову (руб.)		188,71
окупаемость на 1 руб. затрат (руб.)		6,43

Примечание – контрольная группа – выращивание телят на основном рационе; опытная группа – выращивание телят на основном рационе с симбиотическим препаратом

Из данных таблицы 2, в которой представлены основные результаты исследований, следует, что среднесуточные привесы телят опытной группы выше, чем телят контрольной на 26,95% (796 и 627 соответственно), наблюдается снижение себестоимости продукции на 1 кг привеса на 30,27%, уменьшается заболеваемость молодняка на 64,29%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что разработка и применение симбиотических препаратов в рационах кормления телят молочного периода позволяет снизить дефицит одной из основных лимитирующих аминокислот – лизина, что приводит к повышению продуктивности и улучшению основных экономических показателей.

Использование симбиотического препарата позволяет снизить заболеваемость молодняка КРС и уменьшить затраты на лекарственные средства при выращивании.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Панин, А.Н. Пробиотики – неотъемлемый компонент рационального кормления животных / А.Н. Панин, Н.И. Малик // *Ветеринария*, 2006. – №7. – С. 3–6.
- 2 Самуйленко, А.А. Эффективность применения симбиотического препарата на основе штамма *Escherichia coli* VL-613 при доращивании поросят послеотъемного периода / А.А. Самуйленко, Е.Э. Школьников, А.А. Раевский, И.В. Павленко, В.В. Меньшенин // *Свиноводство*. – М., 2012. – № 1 – С. 42–43.
- 3 Самуйленко, А.А. Задачи биотехнологии в реализации доктрины продовольственной безопасности Российской Федерации / А.А. Самуйленко, А.А. Раевский, Н.А. Бондарева [и др.] // *Ветеринария и кормление*. – 2011 – №2 – С.22–29.
- 4 Эрнст, Л.К. Энтеробактерии в животноводстве / Л.К. Эрнст // ФГУП: «Типография». – М., 2011. – 343 с.
- 5 Школьников, Е.Э. Экобиотехнологические препараты для агропромышленного комплекса России / Е.Э. Школьников, Н.К. Еремец, И.В. Павленко, Л.А. Неминущая, Т.А. Скотникова, Э.Ф. Токарик, И.В. Бобровская, Д.Н. Филимонов, В.А. Гаврилов, И.В. Ковальский, З.А. Канарская, И.А. Хусаинов // *Вестник Казанского технологического университета*. – 2014. – Т. 17. – №13. – С. 255–263.
- 6 Шендеров, Б.А. Перспективы и проблема развития биотехнологии в рамках единого экономического пространства стран содружества / Б.А. Шендеров // Минск, 2005. – 262с.

Раздел 7. УДОБРЕНИЯ

УДК 619:615.37.012

ИНКАПСУЛИРОВАНИЕ БИОУДОБРЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИМЕРОВ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

С.А. ГРИНЬ¹, А.Я. САМУЙЛЕНКО¹, С.А. ЛЕРМОНТОВ²,
Г.Н. РУБЦОВА¹, С.М. ШИНКАРЕВ¹

¹ФБГНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», г. Щелково, РФ

²Институт физиологически активных веществ РАН, г. Черноголовка, РФ

Поступила в редакцию 10.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

В первом десятилетии XXI века остро встал вопрос продовольственного обеспечения населения Земли. По расчетам ООН решение данной проблемы возможно при увеличении производства продовольствия на 50% к 2030 году [1]. Согласно этому утверждена Доктрина продовольственной безопасности Российской Федерации [2,3], в которой развиваются положения Стратегии национальной безопасности Российской Федерации до 2020 года, касающиеся продовольственной безопасности Российской Федерации. Согласно концепции продовольственной безопасности (ПБ) она включает две составляющие: первая – обеспечение населения за счет собственного производства основными видами продовольствия в соответствии с рациональными нормами здорового питания в объемах, достаточных для поддержания активной жизни; вторая – высокое качество и безопасность продуктов. Определяющую роль в обеспечении продовольственной безопасности играют сельское хозяйство и пищевая промышленность.

Решение актуальных проблем развития сельского хозяйства напрямую связано [4,5]:

- с переводом отрасли на современные агропромышленные технологии, что поднимет производство сельхозпродукции до уровня, который позволит полностью вытеснить импортные продовольственные товары;
- со снижением себестоимости и улучшением качества продукции, что также возможно только при использовании конкурентоспособных технологий ее производства и переработки.

В основе биопрепаратов для растений (биофунгицидов) – полезные живые микроорганизмы, созданные самой природой и не содержащие патогенной микрофлоры. Важное достоинство таких биопрепаратов – биотехнологический способ получения и связанная с этим их экологическая чистота; экономическая эффективность по сравнению с химическими аналогами; повышение качества сельскохозяйственной продукции, обеспечение ее безопасности и гармонии с окружающей средой [4, 5].

Повышение урожайности сельскохозяйственных растений связано, в первую очередь, с улучшением их азотного питания, причем растениям ну-

жен только связанный, а не молекулярный азот, который содержится в атмосфере воздуха в больших количествах. Ввиду значительного удорожания минеральных удобрений и определённых ограничений для их применения и благодаря освоению промышленных биотехнологий переработки биологических отходов, в последнее время особая роль в восстановлении и поддержании плодородия земель отводится продукту такой переработки, а именно высококачественным органическим удобрениям. Дефицит азота в значительной степени компенсируется биологическим путем, в основном, за счет запаса азота, аккумулированного в почве микроорганизмами, в первую очередь, азотфиксирующими.

Биоудобрения по многим показателям в несколько раз лучше других органических удобрений (навоз, помет, торф). Вот некоторые из них:

1 Отсутствие способных к прорастанию семян сорняков, наличие которых приводит к потере урожая от 5–7 центнеров злаковых культур с одного гектара.

2 Отсутствие патогенной микрофлоры (например, в навозе могут содержаться свыше 100 опасных для животных и человека болезней: сибирская язва, туберкулез, бруцеллёз, паратиф, паратуберкулез, ящур, сальмонеллез, аскаридоз, кишечные инфекции). Благодаря специальной технологии переработки в биогазовой установке биоудобрения полностью обеззаражены от патогенной микрофлоры.

3 Наличие активной микрофлоры, которая способствует интенсивному росту растений (10^{12} – 10^{14} колоний/г микрофлоры) при полном отсутствии патогенной микрофлоры.

4 Отсутствие адаптационного периода – биоудобрения, благодаря своей форме, начинают эффективно работать сразу при внесении.

5 Стойкость к вымыванию – вымывание из почвы питательных элементов за сезон уменьшается от 80% органических удобрений до 15% биоудобрений, поэтому они будут работать на 3–5 лет дольше, чем обычные удобрения.

6 Максимальное сохранение и накопление азота. В биоудобрениях благодаря анаэробному сбраживанию органических отходов в биогазовой установке количество общего азота N сохранится полностью, кроме того, содержащее растворимого азота NH_4 -n увеличивается на 10–15%.

7 Экологическое влияние на почву. Биоудобрения являются абсолютно чистым экологическим удобрением, тогда как органические удобрения в не переработанном виде наносят больший вред почве, загрязняя его и грунтовые воды.

В медицине и пищевой промышленности все большее распространение получает такая технология получения готовой формы биологически активного препарата, как инкапсулирование. Инкапсуляция – это иммобилизация активных ингредиентов в полимерной оболочке. Это позволяет избежать негативных характеристик препарата как для жидкой, так и сухой форм. Инокулянты могут быть влажными и сухими.

В практику сельского хозяйства прочно вошел прием инокуляции – предпосевная обработка семян бобовых растений препаратом клубеньковых бактерий соответствующего вида. Основная идея состоит в том, чтобы уве-

личить содержание в почве азотфиксирующих бактерий типа *Azotobakter*.

На сегодняшний день спектр таких препаратов, в том числе и отечественных, достаточно широк. Среди них «Байкал»; «Азотобактерин» – препарат азотобактера, предназначенный для обработки разных видов сельскохозяйственных растений; «ЭМ-препарат», созданный по специальной технологии концентрат в виде жидкости, в которой выращено большое количество анаэробических (полезных) микроорганизмов, обитающих в почве; «ГУМАТЭМ» – вода, гумат, симбиоз почвенных микроорганизмов, настои растительных компонентов хвои и кора сосны обыкновенной, багульника болотного, черемухи, полыни обыкновенной, уксусной кислоты; ВВ-Ф – сочетание полезные свойства азотфиксирующих, молочнокислых, фотосинтезирующих, других бактерий, актиномицетов, грибов и модифицированных природных минеральных композитов (вулканические пеплы, глины, трепелы, цеолиты, диатомиты и т. д.); биоудобрение «Возрождение» (ООО «Агроком», г. Москва), состоящее из различных аэробных и анаэробных бактерий, а также молочнокислых бактерий, дрожжей и грибов; биоудобрение на основе торфа, (торфяная суспензия, минеральные добавки и высокоактивные, конкурентоспособные штаммы клубеньковых бактерий).

Поскольку метод инкапсулирования позволяет работать с активными веществами в мягких условиях, он наиболее востребован для стабилизации или защиты лекарственных веществ, микроорганизмов, ферментов и клеток в полимерной матрице. К преимуществам метода также относится возможность масштабирования процесса и проведения эксперимента в непрерывном режиме.

Для создания оболочек капсул используют полимеры: альгинат, желатин, пектин, карраген, сульфатная целлюлоза, хитозан, разнообразные воски. Полимерная оболочка служит защитой активного компонента, барьером, проницаемым только для определенных веществ. Очень важной характеристикой полимерных оболочек является их способность к саморазложению в условиях внешней среды. Использование биоразлагаемых полимеров для оболочек капсул позволяет создавать препараты пролонгированного действия.

Полимолочная кислота (ПМК) занимает уникальную нишу среди биоматериалов, что связано с ее технологичностью, эксплуатационными характеристиками, защитными свойствами и механической прочностью. Полимеры на её основе являются наиболее перспективными среди полимеров, получаемых из возобновляемых сырьевых источников. Они не только являются биосовместимыми и биоразлагаемыми, но также их можно обрабатывать, используя стандартное технологическое оборудование. Таким образом, разработка и создание инкапсулированных биоудобрений является актуальной задачей современного АПК в аспектах повышения его эффективности и экологичности. Эта задача должна решаться в технологическом и техническом аспекте.

В 2012–2014 годах во ВНИТИБП начата и продолжается работа по получению и использованию молочной кислоты и ее производных (полимеров и сополимеров) для нужд АПК [6, 7].

МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ, ОБСУЖДЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ

По результатам анализа литературных данных и патентной информации показана перспективность использования в составе биоудобрений консорциума азотфиксирующих бактерий в инкапсулированной форме с использованием полимолочной кислоты.

В лабораторных условиях освоен режим глубинного культивирования в безазотистой питательной среде азотобактерий непатогенного штамма *Azotobacter chroococcum* (получен в Государственном научно-исследовательском институте биосинтеза белковых веществ /Госниисинтезбелок/, хранится в коллекции штаммов института). Для стабилизации активности живых бактерий полученную биомассу смешивали с защитной средой СПЖ (сахароза, пептон, желатина) в соотношении 1:1 (по объёму) и подвергали сублимационному высушиванию на лабораторном холодильном и сублимационном оборудовании «Revco» и S.M.J. «USIFROID».

Показана безвредность опытных серий азотфиксирующих бактерий для развивающихся куриных эмбрионов (по тесту эмбриотоксичности, разработанному в отделе обеспечения качества ЛС для животных) и для лабораторных животных (белые нелинейные мыши).

Разработаны приемы получения в лабораторных условиях полимеров молочной кислоты: проведены экспериментальные исследования методов обезвоживания молочной кислоты, получения бутиллактата, получения олигомеров на основе безводной молочной кислоты и бутиллактата, получения лактида из олигомеров молочной кислоты и полимеризация лактида в полимолочную кислоту.

В процессе работы:

- получены олигомеры молочной кислоты в присутствии катализаторов на основе солей олова и твёрдых кислот;

- разработаны две методики полимеризации D,L-молочной кислоты в полимолочную кислоту: прямая поликонденсация молочной кислоты в присутствии катализаторов и растворителей для азеотропной отгонки образующейся воды; полимеризация лактида в полимолочную кислоту (выход полимолочной кислоты составил 84 %);

- с целью образования разветвленных полимеров разработаны две методики использования глицерина в качестве сшивающего агента: некаталитическая поликонденсация и поликонденсация с применением в качестве катализатора хлорида олова, SnCl_2 ;

- проведена работа по оптимизации процесса получения бутиллактата и показано, что оптимальным вариантом является проведение этерификации при соотношении молочная кислота : бутиллактат = 1: 3.3 с удалением образующейся воды в виде азеотропа с бутанолом и возвращением бутанола обратно в реакционную смесь;

- проведено исследование свойств образцов исходного продукта молочной кислоты и опытных образцов олигомеров с использованием различных методов анализа и испытаний с определением спектров состава и строения концентрированной молочной кислоты при помощи метода ядерного магнитного резонанса (ЯМР); ИК – спектров олигомеров; молекулярно-массовых характеристик (методом гель-проникающей хроматографии –

ГПХ).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показана перспективность использования в составе биоудобрений консорциума азотфиксирующих бактерий в инкапсулированной форме с использованием полимолочной кислоты.

В лабораторных условиях разработаны режимы выращивания культуры азотобактерий *Azotobacter chroococcum*.

Дана оценка современного состояния научного знания в области синтеза полимеров молочной кислоты.

Разработаны четыре методики полимеризации олигомеров молочной кислоты в полимолочную кислоту.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Розовенко, М. О национальных стандартах продовольственной безопасности / М.О. Розовенко // *АгроРынок*, апрель, 2010. – С.6–7.
- 2 Доктрина продовольственной безопасности России. Указ Президента Российской Федерации от 30 января 2010г.
- 3 Стратегии национальной безопасности Российской Федерации до 2020 года. Указ Президента Российской Федерации от 12 мая 2009г. №537.
- 4 Ярошенко, В.А. Микробиологическое оздоровление почвы и растений с использованием отходов свеклосахарного производства / В.А. Ярошенко, О.Н. Клименко // *Интернет-сайт*. – Февраль 2010 г.
- 5 Штрук, Ю. Последние тенденции на международном рынке кормов / Ю. Штрук // *Бизнес Партнер*. – М., – 2009. – С.32–35.
- 6 Шинкарев, С.М. Физико-химические свойства экспериментальных образцов полимеров на основе молочной кислоты / С.М. Шинкарев // *Ветеринария и кормление*. – 2014. – №6. – С. 41–42.
- 7 Самуйленко, А.Я. Научное обеспечение многопрофильных биологических производств инновационными технологиями / А.Я. Самуйленко, И.Л. Боро, С.А. Гринь // *Вестник РАСХН*. – 2011. – №1. – С.33–34.

СОДЕРЖАНИЕ

Раздел 1. БИОТЕХНОЛОГИЯ

1	А.Я. Самуйленко, С.А. Гринь, В.Н. Боровой, Н.В. Мельник, Р.Н. Мельник, А.Я. Дадасян ПРОМЫШЛЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ В ВЕТЕРИНАРИИ	3
2	З.С. Клестова, А.М. Головки ТЕСТИРОВАНИЕ БИОПРЕПАРАТОВ – ЗВЕНО В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ЦЕПИ	9
3	Н.К. Еремец ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ	11
4	А.А. Раевский ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ВЫБОР ФЕРМЕНТАЦИОННОГО ОБОРУДОВАНИЯ	16
5	М.В. Нарущко, А.М. Субботин, С.А. Петров, В.А. Мальчевский ИТОГИ АПРОБАЦИИ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕПТИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ МЕТАБОЛИТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ ПОРОД КОНТРАСТНЫМ ТЕМПЕРАТУРНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ	20
6	Г.П. Маленко, Е.В. Корниенко, А.Б. Романова, Г.Ю. Косовский ВИТРИФИКАЦИЯ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВОГО НОСИТЕЛЯ – ПОЛОГО ВОЛОКНА	24
7	О.Н. Новикова, Ю.В. Ломако, Л.А. Амосова, И.В. Зубовская ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ ТЕРМОЛАБИЛЬНОГО ТОКСИНА В СУПЕРНАТАНТЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР ЭПИЗОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	29
8	А.И. Албулов, М.А. Фролова, В.П. Варламов, А.В. Гринь, Ж.Ю. Мурадян, П.П. Красочко, В.П. Красочко АДЬЮВАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ХИТОЗАНА ПРИ КОНСТРУИРОВАНИИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ И ПРОТИВОВИРУСНЫХ ВАКЦИН	33
9	П.А. Красочко СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К КОНСТРУИРОВАНИЮ ВАКЦИН ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ВИРУСНЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ И ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ ТЕЛЯТ	37
10	А.Ю. Финогенов, В.В. Черняк, М.М. Мистейко, М.А. Ананчиков, А.С. Андрусевич, О.В. Мальчик КОНСТРУИРОВАНИЕ ВАКЦИН ПРОТИВ САЛЬМОНЕЛЛЕЗЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА КОРПУСКУЛЯРНОЙ ЭМУЛЬГИРОВАННОЙ И ЕЕ ЭФФЕКТИВНОСТЬ	44

11	А.Ю. Финогенов, В.В. Черняк, М.М. Мистейко, М.А. Ананчиков, О.В. Мальчик, В.М. Зубковская ШТАММЫ САЛЬМОНЕЛЛ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ КОНСТРУИРОВАНИИ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА	50
12	Е.Э. Школьников, Л.В. Анисимова, Л.Б. Соловьев, Л.А. Коротева, С.В. Тимофеев ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОИЗВОДСТВА ВАКЦИНЫ ПРОТИВ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА СВИНЕЙ	55
13	А.Я. Самуйленко, С.А. Гринь, Ю.И. Барсуков, С.А. Дяченко, И.Н. Матвеева ПРИМЕНЕНИЕ НОВОГО АДЬЮВАНТА ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА АНТИРАБИЧЕСКИХ ВАКЦИН	59
14	М.В. Якубовский ОБОСНОВАНИЕ И СОЗДАНИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ КОМПЛЕКСНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ПАРАЗИТАРНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ	62
15	О.А. Бубашко, Н.В. Кныш, Н.И. Костюк ЛАБОРАТОРНЫЕ ИСПЫТАНИЯ ОПЫТНОЙ СЕРИИ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ, ИНФЕКЦИОННОГО БРОНХИТА КУР, ИНФЕКЦИОННОЙ БУРСАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ И СИНДРОМА СНИЖЕНИЯ ЯЙЦЕНОСКОСТИ	65
16	И.В. Насонов, Н.В. Кныш, О.А. Бубашко, Н.И. Костюк ОТРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА «КМИЭВ-21» ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО ЛАРИНГОТРАХЕИТА ПТИЦ	70
17	Т.А. Скотникова, И.В. Ковальский, Э.Ф. Токарик, С.М. Синковец, Ю.Д. Фролов, А.А. Нежута ВИРУС НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ	75
18	А.А. Згировская, Е.С. Конончик, Ю.В. Ломако ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСА МИКСОМЫ КРОЛИКОВ	80
19	З.Н. Сайфутдинова, М.И. Гулюкин КРИОБИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ПЧЕЛОВОДСТВЕ	87
20	Н.Г. Еремия, А.Н. Загареану ОСОБЕННОСТИ УСОВЕРШЕНСТВОВАННОЙ ТЕХНОЛОГИИ ВЫРАЩИВАНИЯ ПЧЕЛИНЫХ МАТОК	91
21	П.А. Красочко, Д.С. Борисовец, Т.А. Зуйкевич, А.М. Морозов, Т.М. Прокопенкова, И.Н. Деревянко ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ПРЕСНОВОДНЫХ ВОДОЕМОВ	97

Раздел 2. ЭПИЗООТОЛОГИЯ

- Н.М. Пухова, А.Я. Самуйленко, С.А. Гринь, Ю.И. Барсуков,
Е.А. Шубина АНТИРАБИЧЕСКИЕ ВАКЦИНЫ ДЛЯ РЕШЕНИЯ
22 ПРОБЛЕМ СТАБИЛИЗАЦИИ ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ ОБСТАНОВКИ ПО БЕШЕНСТВУ ПЛОТОЯДНЫХ ЖИВОТНЫХ 101
- О.В. Анисина, В.И. Клюкина, М.Н. Романенко КОНТРОЛЬ И МЕРЫ
23 БОРЬБЫ С БЕШЕНСТВОМ СОБАК 107
- В.П. Василькова ПАРАЗИТОЗЫ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО
24 ТРАКТА ТЕЛЯТ 109
- П.А. Красочко, Д.С. Борисовец, Т.А. Зуйкевич, В.В. Черняк,
А.М. Морозов ЛЕЧЕБНАЯ И ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРО- И ПРЕБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЭНТЕРИТАХ ТЕЛЯТ
25 114
- Н.Ю. Щемелева ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТЫЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ
26 ПРОФИЛАКТИКИ И ТЕРАПИИ ПАРАЗИТАРНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ 118
- М.А. Ананчиков, Ю.В. Ломако, Л.А. Амосова, Д.Л. Белянко,
С.В. Дадашко ПУТИ ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИЙ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ У ПОРОСЯТ
27 123
- Р.П. Лизун РИЕМЕРЕЛЛЕЗ ВОДОПЛАВАЮЩЕЙ ПТИЦЫ
28 127
- С. В. Ткаченко ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ СИНДРОМА СНИЖЕНИЯ ЯЙЦЕНОСКОСТИ НА ПТИЦЕФАБРИКАХ УКРАИНЫ В ПЕРИОД 2010–2014 ГОДОВ
29 133
- М.И. Черник ИЗУЧЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ПРОЯВЛЕНИЯ МИКОЗНЫХ ПАТОЛОГИЙ У ПЧЕЛ
30 137

Раздел 3. ИММУНОБИОЛОГИЯ

- Д.М. Рихмаер, А.В. Хованкина, Ю.В. Потириди, Л.М. Межевикина, Г.Ю. Косовский ВЛИЯНИЕ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МЕЗЕНХИМНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КОРОВ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*
31 145
- П.А. Красочко, И.А. Красочко, Д.С. Борисовец, Н.М. Авласко, Л.Д. Андросик СОСТОЯНИЕ ИММУНИТЕТА КОРОВ ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ АССОЦИИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ, ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА И ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ
32 150

33	С.Н. Мотузко, Н.С. Мотузко ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА У КОРОВ РАЗНЫХ ВОЗРАСТОВ ПРИ ИНТЕНСИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЯХ СОДЕРЖАНИЯ	153
34	Мурад Маалуф Бешара Тони, В.Н. Алешкевич, П.А. Красочко ИММУННЫЙ СТАТУС ТЕЛЯТ ПОД ВЛИЯНИЕМ БАЦИНИЛА ПРИ ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ ТРИХОФИТИИ	157
35	Г.И. Устинова, О.Д. Кучерук, Е.В. Жукова, А.Г. Лучкин, Е.М. Сошников РЕЗИСТЕНТНОСТЬ НОВОРОЖДЕННЫХ ТЕЛЯТ ПРИ ВАКЦИНАЦИИ ГЛУБОКОСТЕЛЬНЫХ КОРОВ С ГЛИКОПИНОМ	162
36	Ю.Н. Федоров, О.А. Богомоллова, М.Н. Романенко МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ИММУННОГО СТАТУСА И СТРАТЕГИЯ ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ БОЛЕЗНЕЙ НОВОРОЖДЕННЫХ ТЕЛЯТ	166
37	П.А. Красочко, Д.С. Борисовец, Г.Е. Толяронок ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММУНОСТИМУЛЯТОРА ПРИ ВИРУСНЫХ ПНЕВМОЭНТЕРИТАХ ТЕЛЯТ	171
38	Ю.В. Ломако, П.П. Красочко, Я.П. Яромчик, Л.А. Амосова ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ ИСПЫТАНИЯ АССОЦИИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ КОЛИБАКТЕРИОЗА И КЛЕБСИЕЛЛЕЗА ТЕЛЯТ	176
39	В.В. Малашко, Али Омар Хуссейн Али, А.В. Башура, В.Т. Бозер БАРЬЕРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА ПРИ ГАСТРОЭНТЕРАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ У ТЕЛЯТ	180
40	С.Н. Кузьменкова, В.В. Ковзов, Л.В. Волков ДИАГНОСТИКА И КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ У БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ	187
41	А.В. Бабий, С.Н. Ковальчук ЭНДОГЕННЫЙ ВНУТРЕННИЙ КОНТРОЛЬ ПРИ ИССЛЕДОВАНИЯХ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ	192
42	Ю.И. Тяпша, О.В. Дубаневич РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ПЦР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ КРС	195
43	О.В. Дубаневич, Ю.И. Тяпша СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВИРУСА ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ОДНОВРЕМЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЕЙ ШТАММОВ ВИРУСА НА 1 И 2 ГЕНОТИП	200
44	Ю.И. Тяпша, О.В. Дубаневич ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ВИРУСА ПАРАГРИППА-3	205

45	В.И. Клюкина, О.В. Анисина ДИАГНОСТИКА БЕШЕНСТВА НА ОСНОВЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА	209
46	Н.А. Ковалев, П.А. Красочко, Д.В. Бучукури, М.М. Усень ИМ- МУНОПРОФИЛАКТИКА БЕШЕНСТВА В БЕЛАРУСИ – РАЗРА- БОТКА И ПРОИЗВОДСТВО АНТИРАБИЧЕСКИХ ВАКЦИН (ОБЗОР)	212
47	И.М. Барыкина, Н.А. Кузнецов МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ПРОЯВ- ЛЕНИЕ ПАПИЛЛОМАТОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА	215
48	П.П. Красочко, Я.П. Яромчик, Л.С. Кашко СРАВНИТЕЛЬНАЯ ИММУНОГЕННОСТЬ ВАКЦИН ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОГО РИ- НОТРАХЕИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В УСЛОВИЯХ ХОЗЯЙСТВА, НЕ ПРОВОДЯЩЕГО СПЕЦИФИЧЕСКУЮ ПРОФИ- ЛАКТИКУ	219
49	В.П. Красочко СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ПАРЭНТЕРАЛЬНЫЕ СПОСО- БЫ ВВЕДЕНИЯ ВАКЦИН ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАК- ТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖИВОТНЫХ	223
50	А.А. Антипин, Г.А. Надточей ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СВЯ- ЗЫВАНИЯ ДНК-АПТАМЕРОВ С ПРИОНОМ ГУБКООБРАЗНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ КОРОВ ИЗ ТКАНЕЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВ- НОЙ СИСТЕМЫ	227
51	О.А. Дубровская, А.С. Казакова, И.Р. Иматдинов, А.П. Васильев, А.Д. Серeda, П.А. Красочко, Д.В. Колбасов ИСПЫТАНИЯ ТЕСТ- СИСТЕМЫ ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ АФРИКАН- СКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ МЕТОДОМ ИММУНОБЛОТТИНГА С ИС- ПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА Р30	231
52	И.М. Барыкина, Н.А. Кузнецов ТАКСОНОМИЯ И ГЕНЕТИЧЕ- СКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПАПИЛЛОМАВИРУСОВ КРУПНОГО РО- ГАТОГО СКОТА	235
53	Е.Г. Финогенова, А.Ю. Финогенов, М.М. Мистейко, И.В. Голова- чёва, Н.А. Гелейша ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВОЙ ФРАКЦИИ АН- ТИГЕНА <i>BORDETELLA BRONCHISEPTICA</i> , ОБЛАДАЮЩЕЙ НАИБОЛЕЕ ВЫСОКОЙ ИММУНОГЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ	240
54	Б.В. Сёмин, Я.С. Керученько, И.Д. Керученько, Т.А. Тренделева, О.Г. Леонова, В.И. Попенко, Ю.В. Ильин НЕПРОЦЕССИРУЮ- ЩИЙ СТРУКТУРНЫЙ ПОЛИПРОТЕИН РЕТРОВИРУСА <i>GYP</i> SY КАК ПРОТОТИП ДЛЯ СОЗДАНИЯ ГЛОБУЛЯРНЫХ НАНОЧА- СТИЦ	246
55	М.В. Якубовский, Н.Ю. Щемелева, В.П. Василькова, О.П. Па- хноцкая ИММУНИТЕТ И ЕГО ОСОБЕННОСТИ ПРИ ПАРАЗИТАР- НЫХ БОЛЕЗНЯХ ЖИВОТНЫХ	251

56	Е.А. Степанова УРОВЕНЬ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЛИЧИНОК СТРОНГИЛИАТ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА К АЛЬБЕНДАЗОЛУ	256
57	Д.Н. Федотов, М.П. Кучинский ГОРМОНАЛЬНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ЕВРОПЕЙСКОЙ КОСУЛИ В УСЛОВИЯХ ЗАПОВЕДНИКА	259
58	И.В. Ковальский ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ СУХОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ ПТИЦ	266
59	И.В. Насонов, И.С. Радюш, Н.В. Кныш, О.А. Бубашко ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОПЫТНОГО ОБРАЗЦА ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РЕОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ПТИЦ	271
60	И.С. Радюш ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШТАММА РЕОВИРУСА ПТИЦ «КМИЭВ-V118»	277
61	И.Ю. Ездакова, Е.В. Попова, С.Н. Степнова ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА БЕЛКА ТИМУСА ОВЕЦ	281
62	Я.Я. Тыньо, Е.И. Ярыгина, Д.И. Герасимова, Г.В. Морозова АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА АДЪЮВАНТНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ПРОДУКТОВ, ПОЛУЧАЕМЫХ ИЗ ОТХОДОВ ХВОЙНЫХ ПОРОД РАСТЕНИЙ	285
63	Е.К. Власенко, А.М. Войтович, В.А. Грынчак, Н.В. Дудчик, О.А. Емельянова ПОКАЗАТЕЛИ МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ГЕКСИЛОВОГО ЭФИРА 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ТЕСТАХ <i>IN VITRO</i>	290
64	Л.С. Люлькова, Н.К. Еремец, Л.А. Неминушая ЛАБОРАТОРНЫЙ РАБОЧИЙ ЭТАЛОННЫЙ МАТЕРИАЛ В ОБЕСПЕЧЕНИИ И КОНТРОЛЕ КАЧЕСТВА НАБОРА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ХЛАМИДИОЗА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ	294

Раздел 4. ФАРМАКОЛОГИЯ

65	Е.К. Власенко, В.А. Стельмах, И.И. Ильюкова, В.А. Грынчак ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕКСИЛОВОГО ЭФИРА 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПУТЯХ ОДНОКРАТНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ	298
66	М.П. Кучинский, А.Н. Безбородкин ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОВОГО ВЕТЕРИНАРНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ НАНОСЕЛЕНА	303
67	М.П. Кучинский, Л.Л. Калюта, Т.М. Савчук, Г.М. Кучинская, А.М. Повзун ИЗУЧЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРЕПАРАТА «ХЕПАВЕТИН»	308

- 68 **О.В. Милоста, И.В. Насонов, Р.П. Лизун, С.М. Якубовский, Л.Т. Волчек** ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА «УРАМИН» ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО СМОДЕЛИРОВАННОЙ ПОДАГРЕ У ПТИЦ 313
- 69 **А.А. Воинова, С.П. Ковалев** ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА «ГЕПАТОДЖЕКТ» НА СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ ЛАКТИРУЮЩИХ КОРОВ 318
- 70 **Т.Н. Каменская, С.А. Лукьянчик, И.И. Кузьминский, О.В. Хендогина, А.И. Казинец, О.Г. Галушко** ВЛИЯНИЕ ПРЕБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА «ВАМИ-ЛАКТУЛОЗА» НА КАЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ МОЛОКА КОРОВ 322
- 71 **И.И. Кузьминский, А.В. Лиленко, А.Г. Ботяновский** СРЕДСТВО КОРРЕКЦИИ ГИПОФУНКЦИИ ЯИЧНИКОВ У КОРОВ 326
- 72 **С.Н. Мотузко, Н.С. Мотузко, А.М. Субботин** АКТИВНОСТЬ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ У КОРОВ РАЗНЫХ ВОЗРАСТОВ 330
- 73 **В.А. Стельмах, М.П. Кучинский, С.А. Березовская, И.И. Ильюкова, Т.В. Деменкова** ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ФАРМАКОДИНАМИКИ ГЕЛЯ ПРОТИВОМАСТИТНОГО 334
- 74 **В. О. Мирончик, В.А. Стельмах, Н.К. Юркштович, Ф.Н. Капуцкий, В.А. Алиновская, Т.А. Нитиевская** РАЗРАБОТКА ВЕТЕРИНАРНОГО ПРОТИВОМАСТИТНОГО ПРЕПАРАТА «ДИОКСИЛИН-ГЕЛЬ» 340

Раздел 5. САНИТАРИЯ

- 75 **А.В. Левшенюк, Н.А. Кузнецов** СПОСОБЫ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ДЕЗИНФЕКЦИИ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В УСЛОВИЯХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ. ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАЧЕСТВА АЭРОЗОЛЬНОЙ ДЕЗИНФЕКЦИИ 345
- 76 **П.А. Красочко, В.Н. Дубинич, М.В. Дубинич** ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ МИКОТОКСИКОЗОВ ЖИВОТНЫХ «БИОТОКС» НА КЛЕТКИ КРОВИ СВИНЕЙ 350
- 77 **А.В. Островский, Е.А. Юшковский, П.И. Пахомов** ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА «ИНТРОВИТ А+ОРАЛ» НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ И КАЧЕСТВО ПОЛУЧАЕМОЙ ОТ НИХ ПРОДУКЦИИ 355
- 78 **Л.Л. Кривенок, Т.Н. Каменская, С.А. Лукьянчик, И.И. Кузьминский, М.И. Черник** СРЕДСТВО КРИОКС ДЛЯ ДЕЗИНФЕКЦИИ ЖИВОТНОВОДЧЕСКИХ ПОМЕЩЕНИЙ ПО СОДЕРЖАНИЮ ТЕЛ 359

- 79 **М.В. Якубовский, Ю.В. Григорьев, Т.Я. Мяцова, Т.Н. Каменская, С.А. Лукьянчик, Т.Н. Андреева** ВЛИЯНИЕ ИНСЕКТО-АКАРИЦИДНОГО ПРЕПАРАТА «ЦИПЕРВЕТ» НА КАЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ МЯСА И МОЛОКА 366
- 80 **Р.С. Полторжицкая, М.И. Черник** ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕСТИЦИДОВ 372
- 81 **М.И. Черник, Т.Н. Каменская, Р.С. Полторжицкая, С.А. Лукьянчик, Л.Л. Кривенок** ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНЫЕ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИЕ СРЕДСТВА В ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНЫХ МЕРОПРИЯТИЯХ НА ПЧЕЛОПАСЕКАХ 380

Раздел 6. КОРМЛЕНИЕ ЖИВОТНЫХ

- 82 **В.Ф. Радчиков, Е.Ч. Гирдзиевская** ПРОДУКТИВНОСТЬ И КАЧЕСТВО МЯСА ПРИ ВКЛЮЧЕНИИ В РАЦИОН БЫЧКОВ ГУМАТА НАТРИЯ 386
- 83 **В.Ф. Радчиков, Е.О. Гливанский** ВТОРИЧНЫЕ ПРОДУКТЫ ПРОИЗВОДСТВА САХАРА В КОРМЛЕНИИ ДОЙНЫХ КОРОВ 390
- 84 **М.А. Надаринская, А.И. Козинец, О.Г. Голушко, Т.Г. Козинец** ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВВОДА ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ В КОРМЛЕНИИ МОЛОДНЯКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА 396
- 85 **А.И. Козинец, О.Г. Голушко, Т.Г. Козинец, М.А. Надаринская** «ВАМИ-ЛАКТУЛОЗА» – ДОБАВКА С ПРЕБИОТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ ДЛЯ МОЛОДНЯКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА 401
- 86 **В.И. Еремец, Е.Э. Школьников, И.В. Павленко, Н.К. Еремец, П.А. Красочко** ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ В РАЦИОНАХ КОРМЛЕНИЯ ТЕЛЯТ МОЛОЧНОГО ПЕРИОДА 407

Раздел 7. УДОБРЕНИЯ

- 87 **С.А. Гринь, А.Я. Самуйленко, С.А. Лермонтов, Г.Н. Рубцова, С.М. Шинкарев** ИНКАПСУЛИРОВАНИЕ БИОУДОБРЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИМЕРОВ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ 412